

Hegedüs Rózsa

**Tumorellenes hatóanyagtartalmú peptidhormon származékok
szintézise és vizsgálata**

„Táplálékom legyen a gyógyszerem, és gyógyszerem a táplálékom”

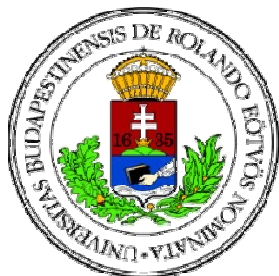
Hippokratész

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

Témavezető:

Dr. Mező Gábor tudományos tanácsadó

MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport



ELTE TTK Kémia Doktori Iskola

Vezető: Dr. Inzelt György egyetemi tanár

Szintetikus kémia, anyagtudomány, biomolekuláris kémia program

Programvezető: Dr. Perczel András egyetemi tanár

Budapest, 2014

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom Dr. Perczel András és Dr. Hudecz Ferenc tanszékvezető egyetemi tanároknak, hogy munkámat az ELTE Kémiai Intézetének Szerves Kémiai Tanszékén, valamint az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoportban lehetővé tették.

Hálásan köszönöm témavezetőmnek, Dr. Mező Gábor tudományos tanácsadónak munkám irányítását, a kimeríthetetlen türelmét és segítőkészségét, amivel nem csak a szakmai munkámat segítette, hanem segített a mindennapok problémáiban is.

Köszönetet mondok továbbá:

Dr. Szabó Ildikónak, Dr. Schlosser Gittának, Dr. Bai Katalin Boglárkának (MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport) és Gali Irénnek (ELTE TTK Kémia Intézet, Szerves Kémiai Tanszék) az ESI-MS mérésekért, valamint, hogy segítettek elsajátítani a készülék használatát,

Dr. Marilena Maneanak (Konstanzi Egyetem, Kémiai Tanszék, Analitikai Kémiai és Biopolimer Szerkezetanalitikai Laboratórium) az enzimatis vizsgálatokban és a cirkuláris dikroizmus vizsgálatokban nyújtott segítségével, valamint a sok szakmai és baráti segítségével, amit Konstanzban és közös munkáink során kaptam tőle,

Dr. Bősze Szilviának, Dr. Orbán Erikának, Dr. Szabó Ildikónak, Fodor Évának és Heinrich Verának (MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport) az *in vitro* sejtbejutás és citosztatikus hatás meghatározására szolgáló kísérletekben nyújtott segítségével,

Köszönöm Medzihradszkyné Dr. Schweiger Hedvignek, Dr. Bősze Szilviának és Kiskó Máriának (MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport) a különböző mikroanalitikai mérések elvégzését.

Dr. Tóvári Józsefnek, Schulcz Ákosnak és Kapuvári Bencének, (Országos Onkológiai Intézet Kísérletes Farmakológiai Osztály, Országos Onkológiai Intézet Biokémiai Osztály Izotóp Labor) az *in vivo* vizsgálatokért.

Dr. Halmos Gábornak és Sipos Évának (Debreceni Egyetem, Biofarmácia Tanszék) a receptor kötődés vizsgálatokért.

Dr. Kiss Évának és Hórvölgyiné Pető Idának (Határfelületi- és Nanoszerkezetek Laboratóriuma (HNL)) a membrán penetrációs vizsgálatokért,

Dr. David Andreu professzornak, a barcelonai Pompeu Fabra Egyetemen működő Proteomika és Fehérje Kémiai Csoport (Proteomics and Protein Chemistry Unit) vezetőjének és a kutatócsoport minden tagjának, hogy segítették barcelonai munkámat.

Köszönöm Bajusz Sándornak a mindig naprakész, kiváló ötleteket.

Köszönet illeti az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport minden tagját, akikhez

bármikor fordulhattam kérdéseimmel. Külön köszönet a 407-es labor mindenkori „lakóinak”. Köszönetet mondok Babos Fruzsínának és Szabados Hajnalkának, akikkel együtt küzdöttük végig a doktorandusz éveket.

Köszönöm Csóka Tamásnak, hogy bármikor fordulhattam hozzá szintetikus szerves kémiát is érintő kérdéseimmel.

Köszönöm barátaim és családtagjaim támogatását.

Végül szeretnék köszönetet mondani az anyagi támogatásért a Doktori Iskolának, alapítványoknak és utazást támogató szervezeteknek. Az ELTE TTK Kémiai Doktori Iskola biztosított számomra három éves ösztöndíjat, majd az Alapítvány a Magyar Peptid- és Fehérjekutatásért alapítványnak a támogatást kutatásaim befejezéséhez. Köszönöm továbbá az Alapítvány a Magyar Peptid- és Fehérjekutatásért alapítványnak és a Richter Centenárium Alapítványnak valamint az Oktatásért Közalapítványnak, hogy támogatták konferenciákon és a Peptidkémiai munkabizottsági üléseken való részvételemet. Köszönöm az NKTH (TÉT magyar-spanyol E-20/2008) segítségét, amely lehetővé tette, hogy spanyol tanulmányúton vehettem részt. Ezen kívül megköszönöm az OTKA (NK77485, K81596, K104045), TAMOP 4.2.1/B-09/1/KONV-2010-0007 anyagi támogatását is, amellyel konferenciákon és németországi tanulmányutakon vehettem részt és biztosította kutatásaimhoz az anyagi feltételeket.

Rövidítésjegyzék

A dolgozatban szereplő kémiai elnevezések helyesírásában, az 1998-ban kiadott, „Útmutató a szerves vegyületek IUPAC-nevezéktanához” című kiadvány ajánlásait követtem.¹ Az aminosavak egy, illetve hárombetűs rövidítéseit a Journal of Peptide Science ajánlása² szerint használtam.

Ac	acetil
ACE	angiotenzin konvertáló enzim
ADME	felszívódás, eloszlás, metabolizmus, kiválasztódás (absorption, distribution, metabolism, excretion)
Aoa	aminooxiacetil
ATPáz	adenozin trifoszfátáz
AP-1	aktivátor protein-1
Bcl-2 fehérje	B sejt limfóma 2 fehérje
Bzl	benzil
Boc	<i>tert</i> -butiloxikarbonil
BOP	benzotriazol-1-il-oxi-trisz(dimetilamino)foszfónium-hexafluorofoszfát
^t Bu	<i>tert</i> -butil
nBu	butiril
iBu	izobutiril
c()	ciklopeptid
CA	krotonil
CD	cirkuláris dikroizmus
4Cpa	4-klórfenilalanin
DAG	diacilglicerol
Dau	daunorubicin
DBU	1,8-diazabiciklo[5.4.0]undek-7-én
DCM	diklórmétán
Dde	1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociklohex-1-ilidén)etil

DIC	<i>N,N'</i> -diizopropilkarbodiimid
DIU	<i>N,N'</i> -diizopropilurea
DIEA	<i>N</i> -diizopropiletilamin
DMF	<i>N,N</i> -dimetil-formamid
DMSO	dimetil-szulfoxid
DNS	dezoxiribonukleinsav
DOTA	1,4,7,10-tetraazaciklododekán-1,4,7,10-tetraecetsav
DOTATOC	(DOTA ⁰ -Phe ¹ -Tyr ³)oktreotid
Dox	doxorubicin
DPPC	1,2-dipalmitoil- <i>sn</i> -glicero-3-foszfatidilkolin
DTT	1,4- <i>DL</i> -ditiotreitol
EAK	poli[Lys-(Glu _{<i>i</i>} - <i>DL</i> -Ala _{<i>m</i>})], ahol <i>i</i> <1 és <i>m</i> ~3
EDDA	etilén-diamin-diecentsav
EDT	1,2-etánditiol
EGF	epidermális növekedési faktor (epidermal growth factor)
EGFR	epidermális növekedési faktor receptor (epidermal growth factor receptor)
erb-B	eritroblasztózis leukémia
ERK	extracelluláris jel által szabályozott kináz
ESI-MS	elektrospray (elektroporlasztásos) ionizációs tömegspektrometria
FACS	fluoreszcencia-aktivált sejt elválasztás (fluorescence-activated cell sorting)
FCS	magzati borjú szérum (fetal calf serum)
Fmoc	9-fluorenilmetoxikarbonil
FSH	follikulus stimuláló hormon
Glp, <E	piroglutaminsav
GnRH	gonadotropin-releasing hormon
GnRH-IR	I-es típusú GnRH receptor
GnRH-IIR	II-es típusú GnRH receptor

GPCR	G-protein kapcsolt receptor (G Protein Coupled Receptor)
GRP	gasztrin-felszabadító peptid (gastrin-releasing peptide)
GST	glutation S-transzferáz
HBTU	2-(1H-benzotriazol-1-il)1,1,3,3-tetrametilurónium-hexafluorofoszfát
HBV	hepatitisz B vírus
HCV	hepatitisz C vírus
HDACi	hiszton deacetiláz inhibitor
Hex	hexanoil
HF	hidrogénfluorid
HIF	hipoxia indukált faktor
HOAt	1-hidroxi-7-aza-benzotriazol
HOBt	1-hidroxibenzotriazol
HPMA	N-(2-hidroxi-propil)-metakrilamid
HPMI	120 mM NaCl, 5mM KCl, 0,4 mM MgCl ₂ , 10 mM HEPES-Na (pH 7,4), 10 mM NaHCO ₃ , 10 mM glükóz, 5 mM Na ₂ HPO ₄
HPV	humán papillóma vírus
HSA	humán szérum albumin
HYNIC	6-hidrazinopiridin-3-karbonsav
ICSH	intersticiális sejt stimuláló hormon
IGF	inzulinszerű növekedési faktor (insulin like growth factor)
IL	interleukin
iNOS	indukálható nitrogén-monoxid szintáz
IP3	inozitol-4,5-triszfoszfát
<i>i.p.</i>	intraperitoneális
<i>i.v.</i>	intravénás
iVA	izovaleril
ivDde	1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociklohex-1-ilidén)-3-metil-butil
JAK	janus kináz

LC-MS	Folyadékkromatográfia-tömegspektrometria (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry)
LH	luteinizáló hormon
LHRH	luteinizáló hormont felszabadító hormon
MAPK	mitogén aktivált protein kináz
MCP	monocita kemoattraktáns fehérje
MDR	multidrog rezisztens
Me	metil
MIP	makrofág gyulladásos kemokin (macrophage infectivity potentiator)
Mtt	4-metiltritol
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid
Myr	mirisztoil
2Nal	2-naftil-alanin
NF- κ B	nukleáris faktor-kappa B
NGF	ideg növekedési faktor (nerve growth factor)
NK sejt	természetes ölő sejt (natural killer)
NMM	N-metil-morfolin
NRF	nukleáris respiratórikus faktor (nuclear respiratory factor)
NSG	Non obese diabetic severe combined immuno deficient interleukine gamma receptor chain knock-out
OD	optikai denzitás
O ₂ Oc	8-amino-3,6-dioxaoktánsav
PABC	<i>p</i> -amino-benziloxikarbonil
3Pal	3-piridil-alanin
Pbf	1,1,4,6,7-pentametil-dihidro-benzofurán-5-szulfonil
PBS	foszfát puffer (phosphate buffered saline)
PDGF	trombocita eredű növekedési faktor (platelet-derived growth factor)
PEG	polietilén-glikol
PKC	protein kináz C

PKM2	piruvát kináz tumor specifikus izoformája
PLC	foszfolipáz-C
PPAR	peroxiszóma proliferáció aktiválta receptor
Pr	propionil
PTPáz	fehérje tirozin foszfataz
PyBOP	benztriazol-1-il-oxi-trisz(pirrolidino)foszfónium-hexafluorofoszfát
Pyr	pirrolino
RP	fordított fázisú (reversed phase)
SCFA	rövid szénláncú zsírsav (short-chain fatty acid)
SD	standard deviáció (szórás)
SPPS	szilárdfázisú peptidszintézis (Solid Phase Peptide Synthesis)
STAT	szignál transzdukciós és aktivátor faktor
TBTA	tris[(1-benzil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil]amin
TBTU	benztriazol-1-il-1,1,3,3-tetrametil-urónium-tetrafluoroborát
TES	triethylsilán
TFA	2,2,2-trifluorecetsav
TFE	2,2,2-trifluoretanol
TIS	triizopropilszilán
TNF	tumor nekrosis faktor
TOC	tirozin-oktreotid
ttkg	testtömeg kilogramm
Trt	tritol
Trisz	tris(hidroximetil)-aminometán
XTT	2,3-bisz-(2-metoxi-4-nitro-5-szulfopenil)-2H-tetrazólium-5-karboxanilid

Tartalomjegyzék

Rövidítésjegyzék	1
Tartalomjegyzék.....	1
1 Bevezetés	1
2 Irodalmi áttekintés	3
2.1 Tumoros megbetegedések	3
2.1.1 Daganatterápia.....	3
2.1.2 Hormonterápia.....	4
2.1.3 Kemoterápia	4
2.1.4 Irányított terápia	5
2.2 A Gonadotropin-releasing hormon (GnRH) élettani szerepe	7
2.2.1 A Gonadotropin-releasing hormon típusai	8
2.2.1.1 A GnRH-I és a tumorterápiában alkalmazható analógjai	9
2.2.1.2 A GnRH-II és a tumorterápiában alkalmazható analógjai	11
2.2.1.3 A GnRH-III	13
2.3 Szomatostatin származékok az irányított tumorterápiában.....	16
2.3.1 RC-121 (H-D-Phe-c(Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys)-Thr-NH ₂)	17
2.3.1.1 Az RC-121, mint irányító molekula.....	17
2.3.1.2 Az RC-121 alkalmazása kombinációs kezelésben.....	18
2.3.2 TT-232 (H-D-Phe-c(Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Cys)-Thr-NH ₂).....	18
2.4 A konyhától a klinikáig: tumor prevenció és kezelés „természetes” úton.....	19
2.4.1 A fitoterapeutikum kurkumin.....	20
2.4.1.1 A kurkumin, mint tumor össejt antikarcinogén	22
2.4.2 Rövid szénláncú zsírsavak (SCFA) szerepe az egészséges bélflórában.....	23
2.5 Antraciklinek	24
2.5.1 2-Pirrolino-doxorubicin.....	25
3 Céltkítűzések	27
4 Alkalmazott módszerek	31
4.1 Szilárdfázisú peptidszintézis (SPPS).....	31
4.2 A módszer kialakulása és elve	31
4.2.1 A lépésenkénti szilárdfázisú peptidszintézis két általánosan alkalmazott stratégiája	33
4.2.1.1 Fmoc/ ^t Bu stratégia	33
4.2.1.2 Szilárd hordozó	34

4.2.2	Kapcsolási eljárások.....	35
4.2.3	A kapcsolat végbemenetelének ellenőrzése.....	37
4.2.4	A peptidek hasítása a gyantáról.....	38
4.2.5	Ciklopeptidek előállítása.....	38
4.3	A peptidek tisztítására és jellemzésére alkalmazott módszerek.....	39
4.3.1	A nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia.....	39
4.3.2	Tömegspektrometria (mass spectrometry, MS).....	39
5	Eredmények és következtetések.....	41
5.1	Négyes helyzetben zsírsav láncokkal módosított daunorubicin-GnRH-III biokonjugátumok szintézise, <i>in vitro</i> és <i>in vivo</i> biológiai vizsgálata, szerkezet-hatás összefüggés vizsgálata.....	41
5.1.1	GnRH-III(⁴ Lys(X), ⁸ Lys(Dau=Aoa)) konjugátumok előállítása.....	42
5.1.1.1	GnRH-III(⁴ Lys(X), ⁸ Lys(Aoa)) peptidek szintézise (X=Pr, iBu, nBu, CA, iVA, Hex, Myr).....	43
5.1.1.2	Daunorubicin tumorelles hatóanyag konjugálása a zsírsavakkal módosított GnRH-III analógokhoz.....	45
5.1.2	A GnRH-III(⁴ Lys(X), ⁸ Lys(Dau=Aoa)) konjugátumok enzimatis stabilitása/degradációja kimotripszin és lizoszómális enzimekkel szemben.....	46
5.1.2.1	A GnRH-III(⁴ Lys(X), ⁸ Lys(Dau=Aoa)) stabilitása sejtenyésztő médiumban.....	47
5.1.2.2	A GnRH-III(⁴ Lys(X), ⁸ Lys(Dau=Aoa)) biokonjugátumok α -kimotripszin emésztő enzim jelenlétében.....	47
5.1.2.3	A GnRH-III(⁴ Lys(X), ⁸ Lys(Dau=Aoa)) biokonjugátumok patkány máj lizozóma homogenátum jelenlétében végzett lebomlási vizsgálata LC-MS módszerrel.....	49
5.1.3	A GnRH-III(⁴ Lys(X), ⁸ Lys(Dau=Aoa)) konjugátumok <i>in vitro</i> citosztatikus hatásának vizsgálata.....	50
5.1.4	A GnRH-III(⁴ Lys(X), ⁸ Lys(Dau=Aoa)) konjugátumok sejtbefutási képessége MCF-7 és HT-29 sejteken.....	51
5.1.5	A GnRH-III(⁴ Lys(X), ⁸ Lys(Dau=Aoa)) konjugátumok másodlagos szerkezetének vizsgálata cirkuláris dikroizmus spektroszkópiával.....	53
5.1.6	Biokonjugátumok lipofilitásának vizsgálata.....	54
5.1.6.1	A GnRH-III(⁴ Lys(X), ⁸ Lys(Dau=Aoa)) konjugátumok víz-oktanol megoszlási hányadosának meghatározása RP-HPLC segítségével.....	55
5.1.6.2	Mérések Langmuir mérleggel: A GnRH-III(⁴ Lys(X), ⁸ Lys(Dau=Aoa)) biokonjugátumok penetrációja DPPC monorétegbe.....	56

5.1.7	A GnRH-III(⁴ Lys(nBu), ⁸ Lys(Dau=Aoa)) biokonjugátum ligand kompetíciós kötődési vizsgálata	57
5.1.8	A GnRH-III(⁴ Lys(nBu), ⁸ Lys(Dau=Aoa)) <i>in vivo</i> antitumor hatása ortotopikus HT-29 xenografton.....	58
5.1.8.1	A daunorubicin <i>in vivo</i> toxicitásának meghatározása	59
5.1.8.2	A GnRH-III(⁴ Lys(nBu), ⁸ Lys(Dau=Aoa)) <i>in vivo</i> tumorellenes hatásának meghatározása	60
5.1.8.2.1	A GnRH-III(⁴ Lys(nBu), ⁸ Lys(Dau=Aoa)) <i>in vivo</i> tumor növekedést gátló hatása ortotopikus HT-29 xenografton, 1. kísérlet	60
5.1.8.2.2	A GnRH-III(⁴ Lys(nBu), ⁸ Lys(Dau=Aoa)) (3) <i>in vivo</i> antitumor hatása ortotopikus HT-29 xenograftokban, 2. kísérlet	62
5.2	Négyes helyzetben vajsavval módosított két daunorubicint tartalmazó GnRH-III biokonjugátumok szintézise, kémiai és <i>in vitro</i> biológiai jellemzése	64
5.2.1	A GnRH-III(⁴ Lys(nBu), ⁸ Lys(Dau=Aoa-X-Lys(Dau=Aoa-X))) konjugátumok előállítás (X= Ø vagy GFLG)	64
5.2.1.1	A GnRH-III(⁴ Lys(nBu), ⁸ Lys(Aoa-X-Lys(Aoa-X))) peptidek szintézise (X= Ø vagy GFLG)	64
5.2.1.2	Konjugálás daunorubicinhez, oxim-kötés kialakítása: GnRH-III(⁴ Lys(nBu), ⁸ Lys(Dau=Aoa-X-Lys(Dau=Aoa-X))) konjugátumok előállítása.....	66
5.2.1.3	A GnRH-III(⁴ Lys(nBu), ⁸ Lys(Dau=Aoa-X-Lys(Dau=Aoa-X))) konjugátumok <i>in vitro</i> citosztatikus hatásának meghatározása MCF-7 és HT-29 sejteken	67
5.2.2	A GnRH-III(⁴ Lys(nBu), ⁸ Lys(Dau=Aoa-X-O ₂ Oc-Lys(Dau=Aoa-X-O ₂ Oc))) konjugátumok (X= Ø vagy GFLG) előállítása	68
5.2.2.1	A GnRH-III(⁴ Lys(nBu), ⁸ Lys(Aoa-X-O ₂ Oc-Lys(Aoa-X-O ₂ Oc))) peptidek szintézise (X= Ø vagy GFLG)	68
5.2.2.2	Konjugálás daunorubicinhez, oxim-kötés kialakítása: GnRH-III(⁴ Lys(nBu), ⁸ Lys(Dau=Aoa-X-O ₂ Oc-Lys(Dau=Aoa-X-O ₂ Oc))) konjugátumok előállítása	70
5.2.3	A GnRH-III(⁴ Lys(nBu), ⁸ Lys(Dau=Aoa-X-Y-Lys(Dau=Aoa-X-Y))) konjugátumok oldékonysági vizsgálatai (X=Ø vagy GFLG, Y=Ø vagy O ₂ Oc)	70
5.2.3.1	A GnRH-III(⁴ Lys(nBu), ⁸ Lys(Dau=Aoa-X-Y-Lys(Dau=Aoa-X-Y))) konjugátumok oldhatóság vizsgálata tömegmérés alapján	70
5.2.3.2	A GnRH-III(⁴ Lys(nBu), ⁸ Lys(Dau=Aoa-X-Y-Lys(Dau=Aoa-X-Y))) konjugátumok oldékonyság vizsgálata folyadékkromatográfiás módszeren alapuló oldékonyság vizsgálata.....	71
5.2.4	A GnRH-III(⁴ Lys(nBu), ⁸ Lys(Dau=Aoa-X-O ₂ Oc-Lys(Dau=Aoa-X-O ₂ Oc))) konjugátumok <i>in vitro</i> citosztatikus hatásának vizsgálata	72

5.2.5	A GnRH-III(⁴ Lys(nBu), ⁸ Lys(Dau=Aoa-X-Y-Lys(Dau=Aoa-X-Y))) konjugátumok patkány máj lizoszóma homogenátum jelenlétében végzett lebomlási vizsgálata LC-MS módszerrel.....	73
5.3	Négyes helyzetben vajsavval módosított 2-pirrolino-daunorubicin-GnRH-III biokonjugátum szintézise, kémiai és <i>in vitro</i> biológiai jellemzése	75
5.3.1	A GnRH-III(⁴ Lys(nBu), ⁸ Lys(PyrDau=Aoa)) konjugátumok előállítása	75
5.3.2	A GnRH-III(⁴ Lys(nBu), ⁸ Lys(PyrDau=Aoa)) konjugátum <i>in vitro</i> citosztatikus hatásának meghatározása MTT-teszt segítségével	76
5.4	Négyes helyzetben vajsavval módosított daunorubicin-GnRH-I és daunorubicin- GnRH-II biokonjugátumok szintézise és <i>in vitro</i> jellemzése	76
5.4.1.1	A GnRH-I(⁴ Lys(nBu), D- ⁶ Lys(Aoa)) és a GnRH-II(⁴ Lys(nBu), D- ⁶ Lys(Aoa)) peptidek szintézise.....	77
5.4.1.2	A [D-Lys ⁶]GnRH-I és a [D-Lys ⁶]GnRH-II származékok konjugálása daunorubicinhez oxim-kötésen keresztül	78
5.4.2	A GnRH-I(⁴ Lys(nBu), D- ⁶ Lys(Dau=Aoa)) és a GnRH-II(⁴ Lys(nBu), D- ⁶ Lys(Dau=Aoa)) konjugátumok <i>in vitro</i> citosztatikus hatásának vizsgálata	78
5.5	Irányított tumorterápiában alkalmazható kurkumin tartalmú vegyület előállítása	79
5.5.1	GnRH-III-kurkumin biokonjugátum előállítása klikk-reakcióval.....	79
5.5.1.1	A 8-as pozícióban azid-csoportot tartalmazó GnRH-III analóg előállítása	79
5.5.1.2	Kurkumin-monoalkin származék előállítása.....	80
5.5.1.3	Klikk-reakció: GnRH-III(⁸ Lys(kurkumin-triazol)) előállítása.....	81
5.6	Daunorubicin tartalmú szomatostatin analóg biokonjugátumok szintézise és <i>in vitro</i> tumorelleses hatásuk vizsgálata	83
5.6.1	Az oxim-kötésű daunorubicin-RC-121 származék előállítása (Dau=Aoa-D-Phe- c[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys]-Thr-NH ₂)	83
5.6.1.1	Az N-terminálisán aminooxiacetil-csoporttal módosított RC-121 származék előállítása (Aoa-D-Phe-c[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys]-Thr-NH ₂).....	84
5.6.1.2	Konjugálás: oxim-kötés kialakítása: Dau=Aoa-RC-121 előállítása	85
5.6.1.3	Dau=Aoa-RC-121 <i>in vitro</i> citosztatikus hatása	85
5.6.2	A TT-232 alapvegyület és a hidrazon-kötésű daunorubicin-TT-232 konjugátum szintézise	86
5.6.2.1	A referencia vegyület TT-232 (H-D-Phe-c[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Cys]-Thr- NH ₂) és a hidrazin csoporttal funkcionizált TT-232 származék peptid előállítása	86
5.6.2.2	Ciklizálás: a TT-232 és hidrazin-funkcionizált TT-232 peptidek előállítása diszulfid-híd kialakításával	87
5.6.2.3	Konjugálás: hidrazon-kötés kialakítása: Dau=N-NH-CO-(CH ₂) ₂ -CO-TT-232 előállítása	88

5.6.3	Az oxim-kötésű daunorubicin-TT-232 származékok előállítása (Dau=Aoa- <i>D</i> -Phe-c[Cys-Tyr- <i>D</i> -Trp-Lys-Cys]-Thr-NH ₂ , Dau=Aoa-Leu-Arg-Arg-Tyr- <i>D</i> -Phe-c[Cys-Tyr- <i>D</i> -Trp-Lys-Cys]-Thr-NH ₂ , Dau=Aoa-Tyr-Arg-Arg-Leu- <i>D</i> -Phe-c[Cys-Tyr- <i>D</i> -Trp-Lys-Cys]-Thr-NH ₂).....	88
5.6.3.1	Az N-terminálisán aminooxiacetil-csoporttal módosított TT-232 származékok előállítása (Aoa- <i>D</i> -Phe-c[Cys-Tyr- <i>D</i> -Trp-Lys-Cys]-Thr-NH ₂ , Aoa-Leu-Arg-Arg-Tyr- <i>D</i> -Phe-c[Cys-Tyr- <i>D</i> -Trp-Lys-Cys]-Thr-NH ₂ , Aoa-Tyr-Arg-Arg-Leu- <i>D</i> -Phe-c[Cys-Tyr- <i>D</i> -Trp-Lys-Cys]-Thr-NH ₂).....	89
5.6.3.2	Konjugálás: oxim-kötés kialakítása: Dau=Aoa-TT-232, Dau=Aoa-YRRL-TT-232, Dau=Aoa-LRRY-TT-232 előállítása	91
5.6.4	A TT-232 származékok <i>in vitro</i> citosztatikus hatásának meghatározása.....	92
5.7	Különböző célbajuttatóegységet tartalmazó konjugátumok alkalmazása kombinációs kezelésekben.....	93
5.7.1	Kombinációs vizsgálatok GnRH és szomatosztatin konjugátumokkal.....	93
6	Kísérleti rész	95
6.1	A szintézisekhez alkalmazott reagensek.....	95
6.2	Általános eljárások	95
6.2.1	A manuális szintéziseknél alkalmazott Fmoc/ ^t Bu stratégia protokollja.....	95
6.2.2	Az automata szintetizátorral (Prelude Peptide Synthesizer) végzett szintéziseknél alkalmazott Fmoc/ ^t Bu stratégia protokollja.....	96
6.2.3	Kaiser-teszt: ninhidrin- és izatin- teszt.....	96
6.2.4	A peptidek és konjugátumok analízise.....	97
6.2.4.1	Analitikai RP-HPLC módszere.....	97
6.2.4.2	Tömegspektrometriás vizsgálat.....	97
6.2.5	Preparatív tisztítás	98
6.3	Négyes helyzetben zsírsav láncokkal módosított daunorubicin-GnRH-III biokonjugátumok előállítása, kémiai és biológiai vizsgálata	99
6.3.1	A GnRH-III(⁴ Lys(X), ⁸ Lys(Dau=Aoa)) konjugátumok előállítása.....	99
6.3.1.1	A GnRH-III(⁴ Lys(X), ⁸ Lys(Aoa)) peptidek szintézise	99
6.3.1.2	Konjugálási reakciók: GnRH-III(⁴ Lys(X), ⁸ Lys(Dau=Aoa)) konjugátumok előállítása	100
6.3.2	A GnRH-III(⁴ Lys(X), ⁸ Lys(Dau=Aoa)) konjugátumok enzimatisz stabilitása/degradációja	100
6.3.2.1	Stabilitás vizsgálatok sejtenyésző médiumban RP-HPLC segítségével.	100
6.3.2.2	A GnRH-III(⁴ Lys(X), ⁸ Lys(Dau=Aoa)) biokonjugátumok α-kimotripszin emésztő enzim jelenlétében.....	101

6.3.2.3	A GnRH-III(⁴ Lys(X), ⁸ Lys(Dau=Aoa)) biokonjugátumok patkány máj lizoszóma homogenátum jelenlétében végzett lebomlási vizsgálata LC-MS módszerrel	101
6.3.3	A GnRH-III(⁴ Lys(X), ⁸ Lys(Dau=Aoa)) konjugátumok <i>in vitro</i> citosztatikus hatásának vizsgálata	102
6.3.4	A GnRH-III(⁴ Lys(X), ⁸ Lys(Dau=Aoa)) konjugátumok sejtbejutási képessége	104
6.3.5	A GnRH-III(⁴ Lys(X), ⁸ Lys(Dau=Aoa)) konjugátumok cirkuláris dikroizmus spektroszkópiai vizsgálata	105
6.3.6	Biokonjugátumok lipofilitásának vizsgálata	105
6.3.6.1	A GnRH-III(⁴ Lys(X), ⁸ Lys(Dau=Aoa)) konjugátumok víz-oktanol megoszlási hányadosának meghatározása	105
6.3.6.2	Langmuir mérleges mérések: A GnRH-III(⁴ Lys(X), ⁸ Lys(Dau=Aoa)) biokonjugátumok penetrációja DPPC monorétegbe	106
6.3.7	A GnRH-III(⁴ Lys(X), ⁸ Lys(Dau=Aoa)) biokonjugátumok ligandum kompetíciós vizsgálata	107
6.3.8	A GnRH-III(⁴ Lys(nBu), ⁸ Lys(Dau=Aoa)) <i>in vivo</i> tumorelles hatása ortotopikus HT-29 xenografton	108
6.4	Négyes helyzetben vajsavval módosított két daunorubicint tartalmazó GnRH-III biokonjugátumok szintézise és vizsgálata	109
6.4.1	A GnRH-III(⁴ Lys(nBu), ⁸ Lys(Dau=Aoa-X-Lys(Dau=Aoa-X))) konjugátumok előállítása (X=Ø vagy GFLG)	109
6.4.1.1	A GnRH-III(⁴ Lys(nBu), ⁸ Lys(Aoa-X-Lys(Aoa-X))) peptidek szintézise (X=Ø vagy GFLG)	109
6.4.1.2	Konjugálás daunorubicinhez, oxim-kötés kialakítása: GnRH-III(⁴ Lys(nBu), ⁸ Lys(Dau=Aoa-X-Lys(Dau=Aoa-X))) konjugátumok (X= Ø vagy GFLG)	110
6.4.1.3	A GnRH-III(⁴ Lys(nBu), ⁸ Lys(Dau=Aoa-X-Lys(Dau=Aoa-X))) konjugátumok <i>in vitro</i> citosztatikus hatásának vizsgálata	111
6.4.2	A GnRH-III(⁴ Lys(nBu), ⁸ Lys(Dau=Aoa-X-O ₂ Oc)-Lys(Dau=Aoa-X-O ₂ Oc))) konjugátumok szintézise (X= Ø vagy GFLG)	111
6.4.3	A GnRH-III(⁴ Lys(nBu), ⁸ Lys(Dau=Aoa-X-Y-Lys(Dau=Aoa-X-Y))) konjugátumok oldékonyság vizsgálatai (X= Ø vagy GFLG, Y= Ø vagy O ₂ Oc)	112
6.4.3.1	A GnRH-III(⁴ Lys(nBu), ⁸ Lys(Dau=Aoa-X-Y-Lys(Dau=Aoa-X-Y))) konjugátumok oldékonyság vizsgálata tömegmérés alapján	112
6.4.3.2	A GnRH-III(⁴ Lys(nBu), ⁸ Lys(Dau=Aoa-X-Y-Lys(Dau=Aoa-X-Y))) konjugátumok folyadékkromatográfiás módszeren alapuló oldékonyság vizsgálata .	112
6.4.4	A GnRH-III(⁴ Lys(nBu), ⁸ Lys(Dau=Aoa-X-Y-Lys(Dau=Aoa-X-Y))) konjugátumok <i>in vitro</i> citosztatikus hatásának vizsgálata	113

6.5	Négyes helyzetben vajsavval módosított 2-pirrolino-daunorubicin-GnRH-III biokonjugátum szintézise és <i>in vitro</i> biológiai	113
6.5.1	A GnRH-III(⁴ Lys(nBu), ⁸ Lys(Aoa)) peptid előállítása	113
6.5.2	Konjugálási reakció: oxim-kötés kialakítása az aminooxiacetilezett peptid és 2-pirrolino-daunorubicin származék között: GnRH-III(⁴ Lys(nBu), ⁸ Lys(PyrDau=Aoa)) konjugátum előállítása	113
6.5.3	A GnRH-III(⁴ Lys(nBu), ⁸ Lys(PyrDau=Aoa)) konjugátumok <i>in vitro</i> citosztatikus hatásának vizsgálata	113
6.6	Négyes helyzetben vajsavval módosított daunorubicin-GnRH-I és daunorubicin-GnRH-II biokonjugátumok szintézise és <i>in vitro</i> biológiai vizsgálata	114
6.6.1	A GnRH-I(⁴ Lys(nBu), D- ⁶ Lys(Dau=Aoa)) és a GnRH-II(⁴ Lys(nBu), D- ⁶ Lys(Dau=Aoa)) konjugátumok előállítása	114
6.6.1.1	A GnRH-I(⁴ Lys(nBu), D- ⁶ Lys(Aoa)) és a GnRH-II(⁴ Lys(nBu), D- ⁶ Lys(Aoa)) peptidek szintézise	114
6.6.1.2	A [D-Lys ⁶]GnRH-I és a [D-Lys ⁶]GnRH-II származékok konjugálása daunorubicinhez oxim-kötéssel keresztül: GnRH-I(⁴ Lys(nBu), D- ⁶ Lys(Dau=Aoa)) és a GnRH-II(⁴ Lys(nBu), D- ⁶ Lys(Dau=Aoa)) konjugátumok	115
6.6.2	A GnRH-I(⁴ Lys(nBu), D- ⁶ Lys(Dau=Aoa)) és a GnRH-II(⁴ Lys(nBu), D- ⁶ Lys(Dau=Aoa)) konjugátumok <i>in vitro</i> citosztatikus hatás vizsgálata	115
6.7	Irányított tumorterápiában alkalmazható kurkumin tartalmú vegyület előállítása és vizsgálata	115
6.7.1	Kurkumin tartalmú GnRH-III konjugátum szintézise	115
6.7.1.1	8-as pozícióban azid csoportot tartalmazó GnRH-III analóg előállítása ..	115
6.7.1.2	Kurkumin propargil származékának előállítása	116
6.7.1.3	Klikk-reakció: GnRH-III(⁸ Lys(kurkumin-triazol)) előállítása	116
6.8	Daunorubicin tartalmú szomatostatin analóg biokonjugátumok szintézise	117
6.8.1.1	Az N-terminálisán aminooxiacetyl-csoporttal módosított RC-121 származék előállítása (Aoa-D-Phe-c[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys]-Thr-NH ₂)	117
6.8.1.2	Konjugálás: oxim-kötés kialakítása: Dau=Aoa-RC-121 (18) előállítása ..	119
6.8.2	A TT-232 referencia peptid (H-D-Phe-c[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Cys]-Thr-NH ₂) és a hidrazon-kötésű daunorubicin-TT232 konjugátum (Dau=N-NH-CO-(CH ₂) ₂ -CO-TT-232) előállítása	119
6.8.2.1	A lineáris TT-232 és a hidrazin csoporttal funkcionizált TT-232 származék peptidek előállítása	119
6.8.2.2	Ciklizálás: ciklizált TT-232 és hidrazin-funkcionizált TT-232 peptidek előállítása diszulfid-híd kialakításával	120

6.8.2.3	Konjugálás: hidrazon-kötés kialakítása: Dau=N-NH-CO-(CH ₂) ₂ -CO-TT-232 előállítása.....	120
6.8.2.4	Az N-terminálisán aminosav-csoporttal módosított TT-232 származékok előállítása (Aoa-D-Phe-c[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Cys]-Thr-NH ₂ , Aoa-Leu-Arg-Arg-Tyr-D-Phe-c[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Cys]-Thr-NH ₂ , Aoa-Tyr-Arg-Arg-Leu-D-Phe-c[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Cys]-Thr-NH ₂).....	121
6.8.2.5	Konjugálás: oxim-kötés kialakítása: Dau=Aoa-TT-232, Dau=Aoa-YRRL-TT-232, Dau=Aoa-LRRY-TT-232 előállítása	122
6.8.3	A TT-232 származékok <i>in vitro</i> citosztatikus hatásának vizsgálata.....	122
6.9	Különböző célbajuttató egységet tartalmazó konjugátumok alkalmazása kombinációban.....	122
7	Összefoglalás	123
7.1	Négyes helyzetben zsírsav láncokkal módosított daunorubicin-GnRH-III biokonjugátumok	124
7.2	Négyes helyzetben vajsavval módosított két daunorubicint tartalmazó GnRH-III biokonjugátumok	124
7.3	Négyes helyzetben vajsavval módosított 2-pirrolino-daunorubicin-GnRH-III biokonjugátum	125
7.4	Négyes helyzetben vajsavval módosított daunorubicin-GnRH-I és GnRH-II biokonjugátumok	125
7.5	Irányított tumorterápiában alkalmazható kurkumin tartalmú vegyületek előállítása.....	125
7.6	Daunorubicin tartalmú szomatosztatin analóg biokonjugátumok	126
7.7	Különböző célbajuttatóegységet tartalmazó konjugátumok alkalmazása kombinációs kezelésekben.....	126
8	Irodalomjegyzék	127
9	Összefoglaló.....	137
10	Summary	138

1 Bevezetés

Munkám célja új tumorelles hatású vegyületek előállítása volt, dolgozatomban bevezetőjében mégis szeretném felhívni a figyelmet a betegség típus megelőzésének fontosságára is, a már kialakult kór gyógyítása mellett.

Doktori dolgozatomban alcímeként a modern orvostudomány atyjától, Hippokratésztől választott idézet is ezt a célt szolgálja. Az ókori görög orvos, természettudós, már 2500 évvel ezelőtt megfogalmazta alapelvét a táplálkozást illetően. Azonban sem mi, sem pedig orvosaink nem fogadjuk meg tanácsát, inkább támaszkodunk a receptre felírt orvosságokra.

Pedig mind a tudományos folyóiratokban megjelenő cikkek, mind a napi média rendszeresen foglalkozik a táplálkozásunkkal, helytelen életmódunkkal és az esetlegesen ezen okokra visszavezethető betegségekkel.

Szakemberek szerint hazánkban, csak úgy, mint a nyugati világban jelentős egészségügyi problémákat okozó 2-es típusú cukorbetegség, a szív- és érrendszeri megbetegedések, a kóros elhízás (obezitás) és számos tumoros megbetegedés kialakulásának kockázata jelentősen csökkenthető lenne életmódunk megváltoztatásával. Táplálkozásunk átalakításával a rákos megbetegedések közül leginkább a vastagbélrák kialakulásának kockázatát csökkenthetnénk.

A tüdő-, gyomor-, máj- és az emlődaganat mellett a szintén jelentős számú áldozatot követelő vastagbélrák nincs kellőképpen a figyelem középpontjában, annak ellenére, hogy Magyarországon mind a férfiak, mind a nők esetében előkelő helyen áll a rosszindulatú rákos megbetegedések között.³ A betegség évek alatt alakul ki, ezért hazánkban akár több tízezren élhetnek már kezdeti stádiumú vastagbélrákkal vagy olyan bélpólipokkal, amelyekről panaszok és szűrővizsgálaton való részvétel híján nem tudnak. Viszont ezekből a rosszindulatú elváltozásokból a következő években náluk is vastagbél-daganat fog kialakulni.

Kialakulásának kockázatát a genetikai tényezők mellett a zsíros, vörös húsban és fehérjében gazdag étrend növelheti, míg a rostokban és komplex szénhidrátokban gazdag táplálkozás megelőző hatású lehet. A nagy mennyiségű zöldség és gyümölcs, valamint finomítatlan teljes kiőrlésű gabona és hüvelyesek bevitelén alapuló étkezés az egészséges életmód alapja. Az ilyen „teljes értékű táplálék” (whole food) alapuló étrenddel biztosíthatjuk a megfelelő mennyiségű ételrost bevitelét. Ezen ételrostok és rezisztens keményítők anaerob bakteriális fermentációjakor a vastagbélben keletkező rövid szénláncú zsírsavak (SCFA) – melyekről dolgozatomban, a 2.5.2-es fejezetben részletesebb leírást adok – potenciális kemoprotektív ágensként viselkednek.⁴

De nem csak az élelmi rostokat hívhatjuk segítségül, ha egyszerű megelőzési módszert, vagy gyógymódot keresünk. Ha a házi orvosunk Hippokratész lenne, az ókori tudós – például lázunk csillapítására – fűzfa levelet írna fel nekünk receptre. Anélkül, hogy pontos mechanizmusukat ismerték volna, számos növény kivonatát (fitokémiai vegyületek) alkalmazták a gyógyászatban elődeink már évezredekkel ezelőtt is. Ilyen például a gyulladáscsökkentő, fájdalomcsillapító hatású szalicin is, amelyet eredetileg a fehér fűz kérgéből vontak ki.

A fitoterápiában alkalmazott vegyületek különféle növényekben fordulnak elő. Leggyakrabban azokért a tulajdonságokért felelősek, melyeket érzékszerveinkkel érzékelünk, mint az áfonya sötétkék színe, vagy a fokhagyma jellegzetes szaga. A fejlődő országok lakosságának 80%-a ma is ezeket a vegyületeket alkalmazó tradicionális medicinát és elsősorban gyógynövényeket használ.^{5,6} A kutatók is több, mint tízezer különböző fitokémiai vegyületnek tulajdonítanak gyógyító hatást olyan betegségekkel szemben, mint a már említett rák, agyvérzés, vagy a metabolikus szindróma anyagcsere-zavar együttes. Ezen vegyületek antioxidáns tulajdonságúak (polifenolok), gyulladáscsökkentő hatásúak, vagy szintén emészthető élelmi rostok. A klinikai gyógyászatban megtalálható gyógyszerek között is találunk számos példát a kategória képviselőire, és a kutatások is egyre inkább a természetben megtalálható, hagyományos orvoslás részét képező vegyületek felé fordulnak. Példaként említhetjük erre, a tiszafa kérgében élő endofita gomba termelte taxolt, mely antimitotikus tulajdonságú, hatékony tumorellenes hatású szer.⁷

Doktori munkám során több tumorellenes hatóanyaggal is foglalkoztam. Ezek egyike a fitokémiai vegyületek családjába tartozó kurkumin, amelyet a *Curcuma longa* gyöktörzséből izoláltak. A kurkuminnal, vagy az ezt tartalmazó keverékkel a turmerikkal számos előrehaladott kutatás foglalkozik a neki tulajdonított tumorellenes, Alzheimer-kórral szembeni, továbbá arthritis, diabétesz és további számtalan betegséggel szembeni jótékony hatása okán.

Azonban ha már kialakult a súlyos, korunkban még mindig nagyon komoly problémát jelentő tumoros megbetegedés, akkor a gyógyításra, így többek között új, még hatékonyabb gyógyszerek kifejlesztésére kell törekednünk. Munkám során célom volt, hogy új, még hatásosabb, ugyanakkor kisebb mellékhatással rendelkező tumorellenes vegyületeket állítsak elő.

2 Irodalmi áttekintés

2.1 Tumoros megbetegedések

A rák világszerte egyike a legfőbb halálozási okoknak. A statisztikák alapján a szív-, és érrendszeri betegségek után a második leggyakoribb halálok. Az Egészségügyi Világszervezet (WHO) statisztikái alapján 2012-ben 14 millió ember szenvedett a különböző típusú rákos megbetegedésekben és 8,2 millió ember halálát okozták ezen betegségek. A becslések szerint a következő évtizedben a 14 milliós esetszám 22 millióra fog emelkedni, ezért rendkívül fontos, hogy megfelelő lépéseket tegyünk ellene. A leggyakoribb típusok a tüdő-, máj-, gyomor-, vastagbél- és emlőrák. A tumorok okozta halálesetek 30%-ban a legfontosabb viselkedés- és táplálkozásbeli kockázati tényezők között a magas testtömegindex, az alacsony gyümölcs és zöldségbevitel, a testmozgás hiánya, az alkoholfogyasztás és a dohányzás áll. Ezek közül is a legjelentősebb rizikó faktor a dohányzás, mely a tumorok okozta halálesetek 20%-át, a tüdőrák 70%-át okozza világszerte. Szintén fontos szót ejtenünk a vírusok, mint a HBV/HCV és a HPV okozta tumoros megbetegedésekről, melyek a fejletlen és közepesen fejlett országokban a rákos halálesetek 20 %-áért felelősek.⁸

A Központi Statisztikai Hivatal adatai alapján Magyarországon a halálesetek egynegyedét a tumoros megbetegedések okozták 2011-ben, melyek között a leggyakoribbak a tüdő-, bőr-, prosztata-, vastagbél- és az emlőrák.³

Az orvosok és biológusok véleménye megegyezik abban, hogy a rák keletkezésének oka az egészséges sejtek szaporodásában ésérésében fennálló szabályozási egyensúly megbomlása.⁹ A rákos sejtek az egészséges sejtekkel szemben kontroll nélkül, gyorsan osztódnak, s egyre több sejtet képeznek. Ennek számos oka lehet (kémiai karcinogén anyagok: pl.: azbeszt, aflatoxin, arzén; fizikai rákkeltők: pl.: hő, dörzsölés; radioaktív sugárzás; biológiai rákkeltők: onkogén vírusok, paraziták; genetikai faktorok), azonban a dolgozatomban részletesen ezekre nem térek ki.

Ahogy már a bevezetőben is írtam, nagy figyelmet kell fordítani a betegségek megelőzésére, a szűrővizsgálatokon való részvételek népszerűsítésére. Viszont a munkám szempontjából sokkal fontosabb a már kialakult tumoros megbetegedések gyógyítása. Ezért a következőkben a terápiás módszereket foglalom röviden össze.

2.1.1 Daganatterápia

A tumoros megbetegedések kezelésére egyetlen általános gyógymódot nem tudunk

találni, mivel a rák kifejezés egy olyan betegség csoportra vonatkozik, amely mintegy 130 féle daganatos megbetegedést foglal magába. A malignus daganatok kezelésére többféle lehetőség van a daganat elhelyezkedésétől, kiterjedésétől, laboratóriumi, szövettani és más vizsgálati eredményektől, a betegség stádiumától (mennyire előrehaladott a betegség, metasztatizált-e már a tumor), a családban előforduló daganatos betegségektől, a beteg korábbi betegségeitől, életkorától, általános fizikai állapotától függően.⁹

A gyógyítás történhet sebészeti úton, kemo-, radio-, immun-, illetve hormonterápiával, irányított terápiával vagy ezek kombinációjával. A beteg kezelésében rendszerint többféle orvosi szakterület specialistája vesz részt, az onkológus szakorvos mellett szükség esetén sebész, radiológus és az adott szervre szakosodott szakorvos is.

A rák azonosítása után elsőként azt kell felmérni, hogy az milyen stádiumban van. Ezután dolgozható csak ki a terápia helyes stratégiája. A kezelések során a kóros sejtszaporodás, a sejtproliferáció kivédése a cél, azonban a jelenlegi gyógymódok nagy része a normál sejtosztódást is érinti.

Munkám során az irányított tumorterápiában alkalmazható tumorelleses szert tartalmazó biokonjugátumokat állítottam elő, melyek hormon származék irányítómolekulájuk révén mind a hormon-, mind a kemoterápia családjába besorolhatók. Ezért röviden ezen terápiákról is említést teszek.

2.1.2 Hormonterápia

Bizonyos tumortípusok (hormon-érzékeny, hormon dependens tumorok) növekedéséhez hormonok szükségesek. Ezen hormonok túladagolásával, amely a receptoruk érzéketlenítéséhez (deszenzitizáció) vezet, vagy termelődésük (overexpresszió) direkt blokkolásával közvetlenül vagy több hormon egymásra hatásának folytán gátolhatjuk az említett tumorok növekedését. A terápia része lehet a hormont termelő mirigy sebészeti úton történő eltávolítása is. A hormon-érzékeny tumorok közé tartoznak egyes emlő-, és prosztatarák típusok. Sebészeti beavatkozást gyakran előzi meg hormonkezelés a tumor visszafejlődése, vagy a műtétet követően az esetleges metasztázisok elpusztítása érdekében.¹⁰

2.1.3 Kemoterápia

A kemoterápia a rákos sejtek szintetikus vagy természetes eredetű gyógyszerekkel, citosztatikumokkal történő elpusztítása. A kemoterápiás szerek gátolják a rákos sejtek növekedését vagy osztódását, ezáltal pusztítva el azokat. A citosztatikumokat gyakran kombinációban alkalmazzák, mert az egyes gyógyszerek erősítik egymás hatását eltérő

hatásmechanizmusuk által.

Néhány citosztatikum a teljesség igénye nélkül:

- alkilezőszerek (DNS szintézis gátlása, vagy hibás replikáció, pl. melfalán),
- antimetabolitok (a köztes anyagcsere vagy enzimek antagonistái, pl. metotrexát),
- antibiotikumok (interkalációs komplexek, pl. antraciklinek),
- antimitotikumok (orsómérgek, az osztódási orsó kialakulását gátolják, pl. vinblasztin).⁹

A citosztatikumok kifejezetten a gyorsan osztódó sejtekre hatnak. Így a tumoros sejtek mellett sajnos az egészséges gyorsan osztódó sejtek is károsodnak, amely a kemoterápia számos mellékhatását okozza. A gyorsan osztódó normál sejtek közül a leggyakrabban érintettek a vérképzősejtek és az emésztőszervi sejtek (száj, gyomor, belek, nyelőcső), az ivarsejtek és a hajhagymák, így a leggyakoribb mellékhatások a fáradékonyság; hajhullás; hányinger; hasmenés; étvágytalanság; a fehérvérsejtek, vérlemezkék számának csökkenése (ebből adódóan az immunszuppresszió és vérzékenység). A káros mellékhatásokat az is fokozza, hogy a hatóanyag véráramból történő gyors kiürülése miatt néha nagy dózisokat kell alkalmazni. Továbbá számolni kell gyógyszerspecifikus mellékhatásokkal is, mint, pl.: az antraciklinekre jellemző kardiotoxicitással.

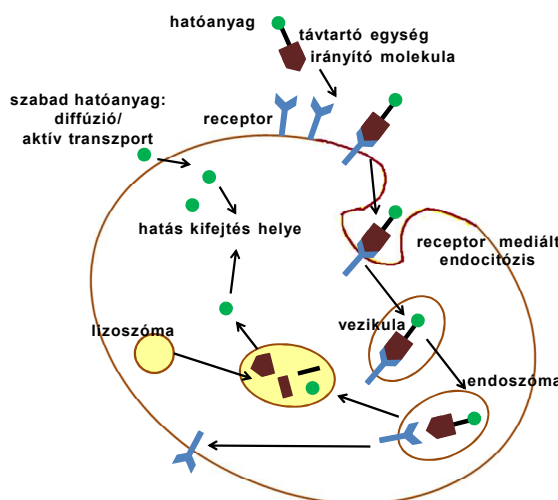
További problémát okozhat, hogy a tumorsejtek rezisztenssé válhatnak az ellenük alkalmazott sejtmérgekre és multidrog rezisztencia (MDR) alakulhat ki.

Mindezen okokból adódóan az utóbbi években a rákkutatás azon megoldások felé fordult, amelyekkel a hatóanyagokat sokkal szelektívebben, célzottan a tumorsejtekbe lehet juttatni. Így nagyobb hatékonyságú és kevesebb mellékhatással rendelkező terápiás eljárások születtek, amelyek többségének bevezetése jelentős áttörést jelenthet a 21. század tumorterápiájában.¹¹

2.1.4 Irányított terápia

A rosszindulatú daganatsejtek molekuláris tulajdonságainak feltérképezése sarkallta a kutatókat egy új típusú gyógyszer családd, az irányított tumorterápia vegyületeinek kifejlesztésére, amelyekkel a tumorsejtek sejtfelszíni struktúrái vehetők célba. Bár a kutatások az 1990-es évektől fordultak aktívan az irányított terápia felé, az alapgondolat („Magic Bullet”) az 1908-ban Nobel-díjjal jutalmazott német immunológustól, Paul Ehrlichtől származik. Ehrlich olyan vegyületet szeretett volna találni, amelynek a kórokozó organizmus iránt specifikus affinitása van, így „mágikus lövedékként” tudja egyenesen az adott kórokozót megátadni.¹²

Az irányított tumorterápiában két fő típust különböztethetünk meg: célba vehetőek (1) az adott daganat típusra jellemző, a rosszindulatú transzformációban kritikus szerepet játszó molekuláris hiba/hibák (onkogének), vagy (2) olyan sejtfelszíni struktúrák (1. ábra), melyek a daganat kialakulása, növekedése, vagy szóródása szempontjából meghatározó, hibás – általában túltermelő, vagy fokozottan aktív – szabályozó/jelátviteli elemek. A második esetben az alkalmazott vegyületek célbajuttató egységként monoklonális antitesteket, cukrokat, lektineket, vagy egyéb receptorspecifikus ligandumokat (pl. peptid hormonok) tartalmaznak, amelyekhez toxinok, radionuklidok vagy kemoterápiás hatóanyagok kapcsolódnak (1. ábra).¹²



1. ábra: Az irányított tumorterápia hatásmechanizmusa a rákos sejten

Ilyen peptid hormonok lehetnek pl.: a gonadotropin-releasing hormon, a szomatosztatin vagy a bombezin.

A hipotalamuszban termelődő neuropeptidek elsődleges szerepe a hipofízis hormonok szekréciójának szabályozása. Emellett azonban különböző szövetekben endokrin, parakrin és neurotransmitter funkcióval is rendelkeznek. Néhány közülük, mint a szomatosztatin, a gasztrin-felszabadító peptid (GRP), vagy a GnRH a keringési rendszerbe lépve és ez által különféle szövetekhez eljutva, endokrin szerepet is betölt. A hipotalamikus hormonok perifériás szövetekben kifejtett hatásmechanizmusa ugyancsak más, mint a hipofízisben tapasztaltak. Lehetséges funkcióik pontos megértésétől még távol vagyunk.^{13,15,16}

Az viszont már bizonyított, hogy az említett peptid hormonok receptorai tumoros sejteken sokkal nagyobb mennyiségben fejeződnek ki, mint az egészséges sejteken. Így az irányított tumorterápiában a célpont szerepét tölthetik be, segítségükkel jelentős szelektivitás érhető el a hatóanyagok tumorsejtbe juttatása során. A peptid hormon kiválasztása során lényeges szempont, hogy a peptid a tumornövekedést önmaga is gátolja.¹⁷

A peptid hormonok és analógjaik – mint hordozómolekulák – a citotoxikus anyagot közvetlenül a tumorsejtekhez szállítják, így növelve a hatóanyag koncentrációt a tumorsejtekben. Ezzel a módszerrel az egészséges sejtek megkímélhetők a felesleges hatóanyag felvételétől.

Az irányított tumorterápia számos előnnyel bír:

- megnövekedett hatóanyag szelektivitás
- oldékonyság növelése
- a hatóanyag lassabb távozása a véráramból
- stabilitásnövekedés a szervezetbeni lebontó folyamatokkal szemben
- retard/késleltetett hatás: egyenletes vérkoncentráció érhető el
- kontrollált hatóanyag felszabadulás
- növelhető az alkalmazott dózis, mellékhatások fokozódása nélkül
- csökkent toxikus mellékhatások
- a rákos sejtek multidrog rezisztenciájának elkerülése

A módszer diagnosztikai célokra is alkalmas. Az *in vivo* receptor szcintigráfia a tumorok és metasztázisaik helyzetének meghatározására radiojelölt peptideket alkalmaz.

2.2 A Gonadotropin-releasing hormon (GnRH) élettani szerepe

A gonadotropin-releasing hormon, vagy más néven luteinizáló hormon-releasing hormon (LHRH) szerkezetének azonosítása és hatásmechanizmusának meghatározása Roger Guillemin és A. V. Schally nevéhez fűződik, melyért 1977-ben Nobel-díjjal jutalmazták őket.¹⁸ A hormon az emlősök szaporodási rendszerének kulcs molekulája. A decapeptid hormon (Glp-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂) a hipotalamuszban képződik és szekretálódik, a hipofízisen keresztül jut el az adenohipofízisbe. Majd a GnRH receptorokhoz kapcsolódva szabályozza a gonadotrop hormonok (FSH: follikulus stimuláló hormon, LH: luteinizáló hormon) szekrécióját a hipofízisben, melyek irányítják az ivarsejtképződés folyamatát és a szteroidhormonok termelődését.¹⁹ Az FSH szabályozza a szaporodási folyamatok mellett az emberi szervezet növekedését, fejlődését, pubertáskori érését. A nők esetén az FSH a petefészekben a primer follikulusokat (tüszőket) serkenti érésre, valamint az ösztrogén termelődését szabályozza. A tüsző növekedés hatására inhibin szabadul fel, amely leállítja az FSH termelődését. A férfiaknál a herében található Sertoli-féle dajkasejtek androgénkötő fehérjeinek termelődését fokozza, ez által a spermatogenezisben is fontos szerepet tölt be. Az LH hirtelen megnövekedése váltja ki a nők szervezetében az ovulációt. A

férfiak esetében az LH, vagy ICSH (intersticiális sejt stimuláló hormon) a Leydig-sejtek tesztoszteron termelését stimulálja.^{20,21}

2.2.1 A Gonadotropin-releasing hormon típusai

A GnRH túl azon, hogy kulcs szerepet tölt be a szaporodás szabályozásában, változatos neuroendokrin, parakrin, autokrin és neurotranszmitter/neuromodulátori funkciókkal bír a központi és perifériás idegrendszerben, valamint számos perifériás szövetben. Azért, hogy ez a tárg funkciókör gyógy- és termékenységét elősegítő terápiák kifejlesztésére felhasználható legyen, a gonadotropin-releasing hormont az állatvilágban széleskörű vizsgálat alá vonták.²² Az előgerinchúrosokban és gerincesekben 25 GnRH variánst (14 gerinces, 11 nem gerinces) azonosítottak (1. táblázat).

A gerincesek többségében 2 különböző GnRH izoformát és azok receptorait mutatták ki, míg a GnRH-III kizárólag a halakban található meg. Egy kivétellel (polip: 12 aminosav²³) az összes izoforma 10 aminosavból épül fel, amelyek csupán az 5.-8. pozícióban lévő aminosavakban térnek el egymástól, Glp¹-His²-Trp³-Ser⁴ és a Pro⁹-Gly¹⁰-amid részletek mindegyikben megegyeznek.^{24,25} A különböző típusú GnRH izoformák egy egyeden belül is sokféle különböző szövettípusban azonosíthatók, ami arra enged következtetni, hogy az egyedfejlődés során jelentős funkciót töltöttek be.

1. táblázat: Néhány azonosított GnRH izoforma elsődleges szerkezete²²

GnRH típus	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
GnRH-I (mGnRH)	Glp	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Arg	Pro	Gly-NH ₂
GnRH-II (cGnRH-II)	Glp	His	Trp	Ser	His	Gly	Trp	Tyr	Pro	Gly-NH ₂
cGnRH-I	Glp	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Gln	Pro	Gly-NH ₂
rGnRH	Glp	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Trp	Pro	Gly-NH ₂
lGnRH-III	Glp	His	Trp	Ser	His	Asp	Trp	Lys	Pro	Gly-NH ₂
sGnRH	Glp	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Trp	Leu	Pro	Gly-NH ₂
cfGnRH	Glp	His	Trp	Ser	His	Gly	Leu	Pro	Pro	Gly-NH ₂
dfGnRH	Glp	His	Trp	Ser	His	Gly	Trp	Leu	Pro	Gly-NH ₂

m: mammalian=emlős, c: chicken=csirke, r: amphibian=kétéltű, l: lamprey=ingola, s: salmon=lazac, cf: catfish=törpeharcsa, df: dogfish=tüskescápa; Glp=piroglutaminsav

A GnRH és analógjai a G-fehérjéhez kapcsolt receptorok (GPCR) családjába tartozó GnRH-receptorokon keresztül fejtik ki hatásukat. A GnRH és agonistái hatására a receptorokhoz kapcsolt G_q-fehérjék aktiválódnak, és egy jelátviteli folyamat során a sejtmembránban található aktiválódott foszfolipáz-C (PLC) a foszfatidil-inozitol-4,5-

biszfoszfátot inozitol-1,4,5-triszfoszfátra (IP3) és diacilglicerolra (DAG) hasítja. A DAG aktiválja a protein kináz C (PKC) enzimet, az IP3 felszabadulása pedig kalciumionok kiáramlásához vezet a sejten belüli kalciumraktárakból. A folyamatok rövidtávú hatása az LH és FSH szekréciója, majd hosszú távon szintézisük serkentése.

2.2.1.1 A GnRH-I és a tumorterápiában alkalmazható analógjai

Az elsőként felfedezett és kezdetben, az emlősökben egyetlennek vélt típust a továbbiak felfedezése után GnRH-I-nek nevezték el, amely párhuzamosan használatos az irodalomban a hGnRH, az mGnRH és az LHRH jelölésekkel.

A hipotalamusz neuronjaiban termelődő, és onnan pulzusszerűen a keringéssel a hipofízisbe kerülő GnRH-I központi szerepet játszik a szaporodásban, ahogyan azt 2.2-es fejezet elején bemutatam. A GnRH-I valószínűsíthetően neuromodulátorként is viselkedik gének, különösen a fehérje tirozin foszfatázok alulműködésének kiváltásával.

A GnRH-I hormont és analógjait a hormonfüggő betegségek kezelésében széles körben alkalmazzák. Amennyiben alacsony dózisban pulzáló jelleggel kezelnek szintetikus GnRH-val hipogonadizmusban szenvedő nőket és férfiakat, akkor visszaállítható a kezelték termékenysége azáltal, hogy stimulálják az endogén GnRH termelődését. A GnRH vagy agonistáinak (buzerelin, gozerelin, luprin) folyamatos adagolása a hipofízisben a GnRH receptorok deszenzitizációját okozza, ami hosszabb távon (hetek) a gonadotropin szekréció hiányában a petefészek és a here funkciók csökkenéséhez vezet. Ez a gonádok szteroid hormon termelésének elfojtását eredményezi, aminek következtében a szteroid függő szövetek növekedése gátlődik. Ez a kémiai kastráció néven is ismert jelenség az alapja a hormonfüggő tumorokat (androgén dependens prosztata-, ösztrogén dependens emlőtumor), a jóindulatú prosztata megnagyobbodást, endometriózist, női terméketlenséget (mesterséges megtermékenyítés) kezelő GnRH terápiáknak.^{26,27}

Másrészt, a GnRH analógok a gonád-hormonok gátlásától függetlenül közvetlen tumorelles hatással is rendelkeznek. GnRH agonistákat sikeresen alkalmaztak menopauzán átesett, így szexszteroid hormonokat nem termelő emlőtumoros nőknél, vagy ösztrogén receptort alacsony mértékben kifejező tumorral rendelkező pácienseknél is. Ennek magyarázata az, hogy a GnRH analógok a tumorsejteken található GnRH receptorokon keresztül közvetlenül fejtenek ki tumorelles hatást.^{26,28} Érdekes módon a GnRH receptorok nem csak a hipofízisen, hanem különféle egészséges és számos rosszindulatú tumoron (emlő, petefészek, méh, prosztata, méh mióma, méhnyálkahártya) is kifejeződnek.^{29,30,31} Sőt szaporodásban nem részt vevő szervekben képződő tumorokon (száj-, és gégerák, vesesejtes

karcinóma, agytumor, melanómák, májrák, duktális hasnyálmirigy karcinóma, vastagbél adenokarcinómák) is megtalálhatóak a receptorok.³² A GnRH és receptorainak funkciója a hipofízisen kívüli előfordulási helyeken nem teljesen tisztázott, viszont bizonyított, hogy ezen szövettípusokban a GnRH gátolja a sejt proliferációt és apoptózist (programozott sejthalál) indukál. Tehát a GnRH egy negatív autokrin rendszer része lehet, ami a növekedési faktorok, például az epidermális növekedési faktor (EGF), vagy az inzulinszerű növekedési faktor I (IGF-I) működésében okoz zavart, gátolja a sejtosztódást és sejthalált vált ki.²⁶ Arra a kérdésre, hogy a GnRH-I miért ilyen hatásos a tumorsejtproliferáció gátlásában, magyarázatot adhat az, hogy a GnRH-I receptor (GnRH-IR) rezisztens a GPCR családban egyébként általános és gyors deszenzitizációra. A GnRH-I receptor nagyon lassan internalizálódik, így hosszú ideig marad aktív a sejt felszínén.³³ Ennek valószínűleg az az oka, hogy a 328 aminosavból álló GnRH-IR nem rendelkezik C-terminális citoplazmatikus végződéssel.^{25,26}

A GnRH fentebb felsorolt tulajdonságait kihasználva az elmúlt 30 évben több mint 3000 GnRH származékot állítottak elő, GnRH-I agonistát illetve antagonistát egyaránt. Ezek közül számos vegyület bizonyult fontos terápiás eszköznek a nőgyógyászatban, mesterséges megtermékenyítésben, és az onkológiában. A tumorellesztő hatás kiváltása szempontjából az antagonisták jobb jelöltek lehetnek a hormon terápiaiban, mivel azonnali gonadális hormon szekréció gátlást okoznak „flare-up” hatás (átmeneti serkentési szakasz a szexuálissteroidok termelésében) nélkül.³⁴ Míg az első és második generációs antagonisták hisztamin felszabadulást, sőt akár anafilaxiás reakciót is kiválthattak, addig a harmadik generációs GnRH analógok már az említett mellékhatásoktól mentesen okoznak azonnal csökkenést az LH és az FSH szintjében.³⁴ A tumorterápiában legáltalánosabban használt GnRH-I analógok a triptorelin: $[D-Trp^6]GnRH$; leuprolid: $[D-Leu^6, Pro^9-NH_2]GnRH$; buserelin: $[D-Ser(tBu)^6, Pro^9-NH_2]GnRH$ (szuperagonisták) és cetorelix, ganirelix és az abarelix (szuperantagonisták).²⁴

Ahogy már említettem a GnRH-I receptorok számos, a reprodukcióban részt vevő, továbbá azzal kapcsolatba nem hozható tumortípusok sejtjein megtalálhatók. Így a GnRH analógokat a célzott daganatterápiában is alkalmazhatjuk, mint hordozó molekulát, bár endokrin hatása nem mindig kedvező a tumorterápiában, különösen a nem hormonfüggő tumorok esetén.

Az irányított tumorterápiával kapcsolatos kísérletekben a GnRH-I analógok közül legáltalánosabban a $[D-Lys^6]GnRH-I$ (zoptarelin) származékot használják irányító molekulaként, amihez a *D*-lizin oldalláncán keresztül kapcsolnak hatóanyag molekulákat. A GnRH-I szuperagonista $[D-Lys^6]GnRH-I$ hormont azért találták alkalmasnak hordozó

molekula céljából, mivel a 6-os helyzetű *D*-lizin ϵ -aminocsoportja módosítható akár nagyméretű vegyületekkel is anélkül, hogy elveszítené receptorkötődési képességét. Továbbá a GnRH-I molekulában a glicin – *D*-lizin csere a 6-os helyzetben növeli a vegyület enzim stabilitását.^{32,35} A 80-as évek közepétől A. V. Schally és munkatársai számos olyan konjugátumot állítottak elő, melyekben az irányító molekula a [*D*-Lys⁶]GnRH-I, míg a hatóanyag ciszplatin, melfalán, metotrexát, doxorubicin vagy 2-hidroximetil-antrakinon volt. Majd az *in vitro* és *in vivo* vizsgálatok eredményei alapján hatékonyabb vegyületeket fejlesztettek ki, mint például az AN-152, vagy az AN-207. Előbbiben a hatóanyag molekula szerepét a doxorubicin, utóbbiban pedig a rendkívül hatékony 2-pirrolino-doxorubicin (2.6.1 fejezet) tölti be.^{32,36,37} Az A. V. Schally és munkatársai által kifejlesztett AN-152 (AEZS-108/zoptarelin doxorubicin), melyben észter-kötéssel glutársav távtartó egységen keresztül kapcsoltak doxorubicint a [*D*-Lys⁶]GnRH-I peptidhez, jelenleg a klinikai kísérletek III. fázisában van ovárium tumoron.^{38,39} Az AN-152 kapcsán a biztató eredmények ellenére viszont számolnunk kell mellékhatásokkal is. Ezek egyrészt az észter-kötés alacsony stabilitásából adódnak (korai hatóanyag felszabadulás), másrészt abból, hogy a szuperagonista [*D*-Lys⁶]GnRH-I a hipofizeális receptorokkal is képes kölcsönhatni és ez reverzibilis endokrin mellékhatásokhoz vezethet.

2.2.1.2 A GnRH-II és a tumorterápiában alkalmazható analógjai

A legtöbb gerincesben kettő, de akár három típusa is megtalálható a GnRH hormonnak, ami az evolúció során történt korai génkettőződésre enged következtetni. Az elsőként, a csirkeagyból izolált GnRH-II szerkezete (Glp-His-Trp-Ser-His-Gly-Trp-Tyr-Pro-Gly-NH₂) az elmúlt 500 millió évben nem változott. Ez a típus a fajok széles körében, az állkapcsos halaktól az emberig mindenhol azonos szerkezetben található meg. Az emberi agyban elsősorban a hipotalamuszban expresszálódik, de különösen nagy mennyiségben a középgagyban és a limbikus rendszer részeiben is előfordul. Viszont túlnyomórészt az agy területein kívül, a perifériás szövetekben fejeződik ki (pl.: vese, csontvelő, prosztata és a női szaporító szervek).^{40,41,42}

Ez a szöveti elterjedés és a tény, hogy a szekvencia konzerválódott az evolúció során, arra enged következtetni, hogy a GnRH-II hormonnak fontos, és specifikus feladata van. Feltehetőleg neurotranszmitter/neuromodulátor funkciót tölt be a szervezetben, illetve a szexuális viselkedés kialakításában van szerepe. A feltételezett feladatait a 2. táblázatban foglaltam össze.

2. táblázat: A GnRH-II feltételezett feladatai az emberi szervezetben

Szövet típus	Feltételezett feladat
központi és perifériás idegrendszer	neuromoduláció
medio-bazális hipotalamusz	gonadotropin szekréció
limbikus rendszer	a reprodukciós viselkedés stimulálása
méhnyálkahártya	endokrin funkciók szabályozása
méhlepény	
emlő	
petefészek	
a női szaporítószervek rosszindulatú daganatai	sejtproliferáció gátlás
normál T sejtek	sejtadhézió és sejtmigráció fokozása
tumor T sejtek	

Az, hogy a GnRH-II izoforma a fajok ilyen széles körében megtalálható, arra utal, hogy létezik a GnRH-IR-ral rokon saját receptora. A vizsgálati eredmények azt mutatták, hogy valóban létezik az egyes típusú receptorhoz hasonlóan a GPCR családba tartozó GnRH-II receptor. A GnRH-II receptor szekvenciája 40%-ban megegyezik a GnRH-I receptoréval. Ellentétben a GnRH-IR-ral, a GnRH-IIR rendelkezik C-terminális citoplazmatikus doménnel, amelyen számos treonin és szerin található, amelyek feltehetően foszforilációs helyek és így fontosak lehetnek a gyors deszenzibilizálásban, de a gyors internalizációban is. Ez a szerkezeti különbség fontos lehet a hatóanyagok célzott sejtbejuttatása esetén. Feltételezhető, hogy a GnRH-IIR-ok alkalmasabbak lehetnek az irányító hormon molekulához kapcsolt hatóanyag tumorsejtbe juttatására. A GnRH-II receptorhoz a GnRH-II nagy specifitással kapcsolódik⁴¹, míg a GnRH-I csak kis mértékben és fordítva: a GnRH-IR jobban köti a GnRH-I hormont, mint a GnRH-II-t.

A GnRH-II hormon és annak receptora a szaporító szervek tumoros szöveteiben is megtalálhatók emlősökben, illetve alacsonyabb rendű élőlényekben. Ezen szövetekben a hormon antiproliferatív tulajdonsága már bizonyított. Humán petefészekből, méhnyálkahártyából és emlőből izolált tumorsejteken kimutatták, hogy a GnRH-II és agonistái (pl.: [D-Lys⁶]GnRH-II) szignifikánsan nagyobb mértékben gátolják a sejtproliferációt, mint a GnRH-I agonista triptorelin.⁴³ A GnRH-I és a GnRH-II agonistái tumorsejt proliferáció gátló hatásukat főként foszfortirozin foszfatázok aktiválásával és ezáltal a növekedési faktor receptorok mitogén jelátvitelének gátlásával érik el.^{44,45}

A GnRH-II antagonisták *in vitro* és *in vivo* apoptózist váltanak ki különböző humán tumorsejteken endokrin mellékhatás mentesen. Gründker és munkatársai különböző GnRH-II antagonistákkal ([Ac-D-2Nal¹,D-4Cpa²,D-3Pal³,D-Lys⁶,D-Ala¹⁰]GnRH-II, [Ac-D-2Nal¹,D-4Cpa²,D-3Pal³,D-Lys⁶,Leu⁸,D-Ala¹⁰]GnRH-II, [Ac-D-2Nal¹,D-4Cpa²,D-3Pal^{3,6},D-

Ala¹⁰]GnRH-II) kezeltek humán petefészek, méh és emlő tumorsejteket, melyekben a vegyületek már nanomólos nagyságrendben apoptózist váltottak ki a kaszpáz-3 enzim aktiválása és a mitokondriális membránpotenciál elvesztése által. A kevésbé toxikus GnRH-II antagonisták eredményesen alkalmazhatók petefészek, méh és emlő tumorok endokrin terápiájában.^{43,46}

2.2.1.3 A GnRH-III

A célzott tumorterápiában felhasználható, új GnRH származékok fejlesztése során a cél a hormonális hatás csökkentése mellett a fokozottabb tumorellenes aktivitás és szelektivitás elérése. Mivel GnRH analógokat alkalmaznak szteroid hormon-függő emlő, prosztata és petefészek tumorok kezelésében,⁴⁷ ezért a tengeri ingola (*Petromyzon marinus*) agyából izolált GnRH analóg is a kutatások célkeresztjébe került.⁴⁸ Az Atlanti-óceánban élő parazita állatból az 1-es és 2-es típusú gonadotropin-releasing hormonon kívül egy harmadik típust (ingola/lamprey GnRH-III, lGnRH-III: Glp-His-Trp-Ser-His-Asp-Trp-Lys-Pro-Gly-NH₂) is izoláltak, melyet az emberi szervezetben még nem mutattak ki.^{49,50}

A GnRH-III tumorellenes hatását vizsgáló kísérletek kimutatták, hogy a GnRH-III *in vitro* közvetlen és specifikus tumornövekedést gátló hatással rendelkezik többek között humán emlő, prosztata petefészek és méhnyálkahártya tumorsejteken.⁵¹ Ezen felül a reprodukcióhoz nem köthető szervekben kialakult rosszindulatú elváltozásokkal szemben is hatékony, mikromólos dózisban gátolja a sejtprolifерációt hasnyálmirigy-, és vastagbélrák esetén.

Rendkívül előnyös tulajdonsága továbbá, hogy az emlősökben elhanyagolhatóan kicsi endokrin aktivitást mutat, LH és FSH felszabadító hatása 500-1000-szer kisebb, mint a GnRH-I hatása következtében tapasztalt mennyiség.^{52,53} A GnRH-III további előnye a többi jelentős antitumor hatású GnRH analóggal szemben, hogy csak *L*-aminosavakat tartalmaz.

Bár három típusú GnRH receptort azonosítottak eddig, a legtöbb emlősben csak kettő fordul elő. Ahogyan azt az előző fejezetekben is írtam, az I-es típusú receptor az emlősök hipofízisében található.⁵⁴ A II-es típust számos gerinces fajban felismerték⁵⁵, de a humán szövetekben idáig teljes funkcionális receptorként csak a GnRH-IR-et igazolták.⁵⁶ Így a GnRH-II jelátvitel az I-es típusú receptoron keresztül történik.⁴⁰ A GnRH-III receptor főként a halak szervezetében van jelen, kifejeződését emberben a GnRH-II receptorhoz hasonlóan még nem igazolták. Szerkezetében inkább a II-es típusra hasonlít. A lGnRH-III a receptorkötődési vizsgálatok eredményei alapján mind a GnRH-IR-hez, mind a GnRH-II receptorhoz kötődik.²⁶

A GnRH-III tumorelles hatása valószínűleg az 5.-8. pozíciókat érintő szekvencia részlettől függhet, melyben a III-as analóg különbözik a humán gonadotropin-releasing hormontól. Ezt megvizsgáló Mező Imre és munkatársai számos az 5.-8. szakaszt érintő származékot állítottak elő és tanulmányoztak. A módosításokkal az Asp⁶ és Lys⁸ közötti feltételezett sóhidat, és a karboxipeptidázokkal, aminoszékidázokkal szembeni stabilitásukat vizsgálták. Továbbá a különböző analógok antiproliferatív hatását hasonlították össze az eredeti GnRH-III hatásával. A His⁵ cseréje lizinre a tumorelles hatás elvesztéséhez vezetett a vizsgált sejteken. A hatás megszűnésének oka valószínűleg az, hogy a lizin beépítése, az eredeti feltételezett sóhid megbontásával befolyásolja a molekula konformációját. Viszont, ha a 4-es helyzetbe építettek be lizint a szerin helyett, akkor az már túl távol került ahhoz, hogy megbontsa a sóhidat. Azok a változatok, melyekben a ⁴Ser – ⁴Lys vagy ⁴Ser – ⁴Lys(Ac) csere történt az eredeti molekulához hasonló antiproliferatív hatást mutattak. A 6-os pozícióban az Asp – Glu csere szintén nem befolyásolta a GnRH-III bioaktív konformációját. A 7-es helyzetű Trp indol gyűrűje valószínűleg a receptor kötődésben játszik szerepet, ugyanis a ⁷Trp – ⁷Phe csere hatására jelentős tumorelles hatás csökkenést tapasztaltak.^{57,58} Kovács Magdolna és mtsai. azt vizsgálták meg, hogy a szekvencia módosítása milyen hatással van a származékok endokrin aktivitására, az LH és FSH felszabadulásra. Az eredmények azt mutatták, hogy az 5.-7. pozíciókban 1-1 aminosav csere az endokrin aktivitást nem, de a tumorelles hatást befolyásolta. Vagyis ez a szakasz fontos szerepet tölt be a biológiailag aktív konformáció kialakításában. A 4-es helyzetben történő egyes módosítások megengedettek (pl.: ⁴Ser – ⁴Lys csere), amelynek oka lehet, hogy a szerin sem a hidrogén hidak kialakításában, sem pedig a receptor kötődésért felelős N-terminális régióban nem játszik szerepet. Ezért sem az endokrin aktivitást, sem pedig a tumorelles hatást nem befolyásolja. A 8-as helyzetű lizin a proliferáció gátlásban nem, de a hormonális hatás kifejtésében fontos. A lizin bázikus oldalláncán keresztüli konjugáció, a hormonális hatás jelentős csökkenésével járt.^{59,60}

Az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoportban számos olyan, az irányított tumorterápiában alkalmazható monomer illetve dimer konjugátumot állítottak elő, melyek célbajuttató egységként GnRH-III-at vagy annak származékát tartalmazzák.⁴⁸ Mivel a GnRH-III-ban a 8-as helyzetű lizin nem tölt be fontos szerepet a tumorelles hatás szempontjából, ezért oldalláncának módosításával (konjugáció, ciklizáció, dimerizáció, Ala-scan^{57,58,60,61}) megnövelt tumorelles hatású származékok állíthatók elő. Ezen hormonszármazékokból készített dimer vegyületek és konjugátumok amellet, hogy megnövelt antiproliferatív hatást mutattak különböző tumorsejteken, a hormonális aktivitásuk is alacsonyabb volt, mint az

eredeti hormonnak. Ezek az eredmények is alátámasztják a szabad lizin oldallánc szerepét az endokrin hatásban.^{59,60} A GnRH-III dimer származékok nagyobb hatékonyságát az indokolhatja, hogy a vegyület stabilabb a lebontó enzimekkel szemben, továbbá elképzelhető, hogy a dimer mindkét monomer részegysége hozzákötődik a receptor molekulákhoz, és így a receptorok mikroaggregációját, a receptor-ligandum komplex képződését és internalizációját növeli.⁶²

Amint azt írtam, a 4-es helyzetű szerin sem az endokrin aktivitásban, sem a tumorelles hatás kifejtésében, sem a receptor kötődésben nem játszik szerepet, mégis ez az aminosav, amelyet a legkevésbé módosítottak a különböző analógok kialakításakor.

A GnRH és származékai α -kimotripszin és szubtilizin hatására rendkívül könnyen bomlanak, a fő hasítási hely a ³Trp és a ⁴Ser között található. A vegyületek stabilitása növelhető a ⁴Ser – *N*-Me-⁴Ser illetve ⁴Ser – ⁴Lys(Ac) cserével.^{63,64} Pappa és mtsai. a humán GnRH-I hormonon végeztek módosításokat az enzimatis stabilitás illetve a proliferáció gátlás növelése érdekében. A vegyületek emésztő enzimekkel (tripszin, kimotripszin, pepszin) szembeni stabilitása különösen akkor jelentős, ha szájon át történik a gyógyszer adagolása. A ⁴Ser – *N*-Me-⁴Ser csere szignifikánsan növelte a különböző származékok enzimstabilitását. Eredményeik alapján ez a csere az antiproliferatív hatásban enyhe csökkenést okozott különböző prosztata tumorsejteken vizsgálva.⁶³

Marilena Manea csoportunkkal együttműködve a négyes helyzetű szerin *N*-Me szerinre, lizinre, illetve oldalláncában acetilezett lizinre cserélte daunorubicin tartalmú GnRH-III konjugátumokban Pappa és Mező eredményeit felhasználva.^{63,57} Mivel hasonlóan a GnRH-I-hez a GnRH-III-ban is megengedett ez a módosítás anélkül, hogy ez befolyásolná az eredeti molekula tumorsejt proliferációra gyakorolt hatását.⁵⁷ A ⁴Ser – ⁴Lys vagy a ⁴Ser – ⁴Lys(Ac) csere jelentősen megnövelte az eredeti konjugátumhoz képest (GnRH-III(⁸Lys(Dau=Aoa))) a hatóanyagot tartalmazó konjugátumok *in vitro* citosztatikus hatását LNCaP humán prosztata tumor-, MCF-7 humán emlő adenokarcinóma és HT-29 humán vastagbél adenokarcinóma sejteken. A ⁴Ser – *N*-Me-⁴Ser csere eredményeként a hatás csökkent, bár ezen vegyület esetén tapasztalták a legnagyobb stabilitás növekedést kimotripszinnel szemben.⁶⁴

Az eddigi eredmények alapján tehát a 4-es helyzetű szerin és a 8-as helyzetű lizin módosítása megengedett. A 4-es helyzetben történt változtatások nem befolyásolják sem az antiproliferatív hatást, sem az endokrin aktivitást a peptidben illetve az azt tartalmazó konjugátumban, viszont a megfelelő módosítással növelhető azok enzimstabilitása. A 8-as pozícióban található lizin oldalláncának módosítása alkalmas a hatóanyag molekulákkal

történő kötés kialakítására, mivel a módosítás a receptor kötődést nem befolyásolja, viszont a hormonális hatást csökkenti. Ugyanakkor ⁴Ser – ⁴Lys csere egy újabb konjugációs hely kialakítását is jelenti, amely felhasználható további hatóanyag illetve egyéb, a tumorelles hatás szempontjából hasznos molekula (pl.: apoptózist indukáló peptid) beépítésére.

2.3 Szomatosztatin származékok az irányított tumorterápiában

A szomatosztatin egy természetes 14 aminosavból álló neuropeptid hormon (H-Ala-Gly-c(Cys-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys)-OH), melyet elsőként juh hipotalamuszból izolálták Roger Burgus és munkatársai 1973-ban.^{65,66} A peptid különféle belső és külső elválasztású mirigy termelte hormon kiválasztódását gátolja. Ezek közé tartozik többek között, az agyalapi mirigy hormonja a növekedési hormon, a hasnyálmirigy termelte hormon a glukagon és az inzulin, vagy a gyomorban termelődő gasztrin is. Ezen felül a szomatosztatin közvetlen antiproliferatív hatású, valamint a sejt proliferációban és differenciációban fontos hormonális szabályozó szerepet tölt be. Tehát a szomatosztatin direkt – receptorain keresztül – és indirekt – hormon szint befolyásolásával – fejthet ki tumornövekedés gátlást.⁶⁷ Hatását öt különböző hét transzmembrán doménnel rendelkező receptoron keresztül fejt ki (sstr1-5), melyekhez kapcsolódva és aktiválva azokat, változatos jel kaszkádokat indít be sejt és receptor típustól függően. Nem teljesen tisztázott azonban, hogy melyik szomatosztatin receptorok közvetítik az antiproliferatív hatást, vagy milyen effektor molekulák vesznek részt ebben. Nagy valószínűséggel a hatás kiváltásában a fehérje tirozin foszfatáz (PTPáz) aktivitás stimulálása és apoptotikus folyamatok beindítása alapvető jelentőségű.^{68,69,70}

A természetes szomatosztatin terápiás jelentősége viszonylag alacsony, mivel rövid félféletidővel és rendkívül széles hatásspektrummal rendelkezik.

Ebből adódóan, a szomatosztatin analógok fejlesztésénél az egyik szempont a vegyületek stabilitásának növelése a klinikai alkalmazhatóság érdekében, amit *D*-aminosavak beépítésével érhetünk el. A gyógyászatban alkalmaznak néhány oktapeptid szomatosztatin analógot, mint az oktreotid (H-*D*-Phe-c(Cys-Phe-*D*-Trp-Lys-Thr-Cys)-Thr-ol, peptidalkohol, sandostatin®: Novartis Pharmaceuticals) és a lanreotid (H-*D*-β-Nal-c(Cys-Tyr-*D*-Trp-Lys-Val-Cys)-Thr-NH₂, somatuline®: Ipsen Biotech), különböző hormon-szekretáló, főleg neuroendokrin tumorokkal szemben. Bár magánál az eredeti szomatosztatin molekulánál hatékonyabbak a rövidebb analógok (pl.: az oktreotid 50-szer), egyiknél sem sikerült a hormonális hatást kiküszöbölni. Ez mellékhatásokhoz vezethet, mivel a szomatosztatin receptorok az emberi testben számos helyen megtalálhatók a normál sejtek felszínén is. Az is

problémát okoz az említett analógoknál, hogy hiába kötődnek nagy affinitással egyes szomatosztatin receptorokhoz, ha azok nem fejeződnek ki a tumorsejteken. A tumorsejtek elsősorban sstr2 és sstr5 receptorokat tartalmaznak nagy mennyiségben, kisebb mértékben pedig sstr1 és sstr3 receptorokat. Az sstr4 receptorok pedig viszonylag kis mennyiségben fordulnak elő a tumorsejteken.^{71,72}

Radiojelzett szomatosztatin származékokat a tumorterápia mellett (célzott radioterápia) diagnosztikai célra is felhasználhatnak (*in vivo* képalkotás).⁷²

A szomatosztatin receptor szcintigráfiában a legelterjedtebb radioizotópos nyomjelző vegyület a ¹¹¹In-DTPA-oktreotid (OctreoScan®, Mallinckrodt Medical).⁷³ A vegyületek fejlesztése során az oktreotid szekvenciájának módosítása mellett kicserélték mind a radionuklidot, mind pedig a kelátor molekulát. A ⁶⁸Ga izotóp és a DOTATOC kelátor-oktreotid párosításával megnövekedett receptor (sstr2) kötődést értek el és javult az *in vivo* képalkotás is.⁷⁴ A ^{99m}Tc-EDDA/HYNIC-TOC alkalmazásával szintén jelentős hatékonyság növelés érhető el.⁷⁵

A következőkben két olyan szomatosztatin analógot mutatok be, amelyeket doktori munkám során vizsgáltam.

2.3.1 RC-121 (H-D-Phe-c(Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys)-Thr-NH₂)

A. V. Schally laboratóriumában is számos olyan szomatosztatin analógot állítottak elő melyek a tirozin foszfatáz aktiválása révén fejtik ki tumorelles hatáukat. Ilyen a 2-es, 3-as és 5-ös szomatosztatin receptorhoz nagy affinitással kötődő RC-121 a natív szomatosztatinnál jóval hatékonyabb mértékben képes a tirozin foszfatáz aktivitás közvetlen stimulálására, ami feltehetően az epidermális növekedési faktor receptorát (EGFR) befolyásolva gátolja a tumorsejtek növekedését.⁷⁶ Az RC-121 szignifikáns antitumor aktivitású, valamint a D-aminosavaknak köszönhető fokozott stabilitással bír *in vitro* és *in vivo* is.

2.3.1.1 Az RC-121, mint irányító molekula

Az RC-121 szomatosztatin analóg a célbajuttató molekula a 2-pirrolino-doxorubicin hatóanyag tartalmú AN-238 konjugátumban. A 2-pirrolino-doxorubicin észter-kötéssel kapcsolódik hemiglutarát egységen keresztül a peptid N-terminálisához.^{77,78} A II-es fázisú klinikai vizsgálatokban szereplő AN-162 (Æterna Zentaris, AEZS-124) konjugátumban a doxorubicint az RC-121 peptidhez kapcsolták.⁷² Az AN-162 és az AN-238 konjugátumokkal prosztata-, emlő-, petefészek-, gyomor-, vese-, vastagbél- és hasnyálmirigy tumorsejteken, valamint non-Hodgkins limfóma, továbbá glioblasztóma és tüdő tumorsejteken található

szomatosztatin receptorokat támadhatunk. Mindkét, RC-121 analógot, mint irányító molekulát tartalmazó konjugátum gátolja a felsorolt tumorok és metasztázisaik növekedését.⁷⁹ Azonban, ahogy azt már az AN-152 esetén is említettem, az észter-kötés nem túl előnyös, a kötés típus alacsony stabilitása miatt.

2.3.1.2 Az RC-121 alkalmazása kombinációs kezelésben

A. V. Schally és mtsai. megvizsgálták, milyen tumornövekedés gátlás érhető el *in vivo*, ha az RC-121 szomatosztatin és a triptorelin ($[D\text{-Trp}^6]\text{GnRH-I}$) GnRH-I származékkal kombinációban kezelik a prosztata tumoros kísérleti állatokat. A kombinációs kezeléssel nagyobb mértékű tumornövekedés gátlást értek el, mint az egyes komponensekkel külön-külön, ami szinergista gátló hatást enged feltételezni.⁸⁰

2.3.2 TT-232 (H-D-Phe-c(Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Cys)-Thr-NH₂)

A TT-232 kifejlesztésénél olyan tumorelleses hatású vegyület volt a cél, amely sejten belüli jelátviteli útvonalakon keresztül váltja ki a karcinogenezist. Ennek elérése érdekében a molekulának pl. fehérje kinázok (pl.: tirozin kinázok, protein kináz C) működését szükséges gátolnia.⁸¹

A Kéri György és mtsai. által kifejlesztett TT-232 a szomatosztatin egy olyan öttagú gyűrűs szerkezeti analógja, amely az eredeti molekulával ellentétben nem rendelkezik endokrin aktivitással és az abból adódó mellékhatásokkal (nem hat a növekedési hormon kiválasztódásra vagy a gyomorsav termelésre). Azonban tumorszelektív antiproliferatív aktivitású, továbbá neurogén és nem neurogén gyulladásgátló, valamint fájdalomcsillapító hatású.^{82,83}

A gyulladásgátló hatását a 4-es (sstr4), a tumorelleses hatását pedig az 1-es (sstr1) szomatosztatin receptoron, valamint a piruvát kináz tumor specifikus izoformáján (PKM2) keresztül fejt ki.⁸⁴ A TT-232 mindkét receptorhoz nagy affinitással kötődik, *in vitro* és *in vivo* apoptózist képes kiváltani különböző típusú tumorsejtekben és tumoros állatmodellekben. A hatásért felelős molekuláris mechanizmus mind az intracelluláris tirozin foszfatáz, mind pedig a tirozin kináz aktivitásához köthető. A TT-232 rendkívül hatékony tirozin kináz gátló. Ez azért jelentős, mert a tirozin kináz receptor család a már azonosított és a gyógyászatban célpontként alkalmazott onkogének jelentős részét adja (pl. epidermális növekedési faktor receptor család - trastuzumab).^{85,86}

A TT-232 peptiddel történő rövid távú kezelés irreverzibilis sejtciklus megállást eredményez a G₁/S fázisban főleg az sstr1 receptor aktivációja esetén, amely apoptózist

eredményez. Ezzel ellentétben a hosszútávú kezelés okozta aktív sejthalál független az sstr irányította jelátviteltől. A TT-232 antiproliferatív hatása egy olyan jelátviteli kaszkád aktiválódása útján szabályozódik, mely az extracelluláris jel által szabályozott kináz (ERK)/mitogén aktiválta protein kináz (MAPK) átmeneti aktivitás növekedésével jár. Az ERK/MAPK a p21 ciklin dependens kináz transzkripció aktiválódását és akkumulálódását okozza. Bár a kísérleti eredmények azt mutatják, hogy csak az említett jelátviteli útvonal gátlásával nem blokkolható a TT-232 okozta sejthalál. Tehát a molekula két irányból is „támad”: a szomatosztatin receptor-mediált jelátviteli kaszkád okozta sejtciklus megállással és egy nem teljesen tisztázott, valószínűsíthetően a PKM2-vel kapcsolatos mechanizmus útján, ami apoptózist indukál a sejtben. A vizsgálatok alapján az apoptózis feltétele, hogy a peptid a sejtbe jusson. A sejtben belül a TT-232 feltehetően a hozzá nagy affinitással kötődő piruvát kinázzal kölcsönhat, ezzel előidézve az enzim és a mikrotubulusok disszociációját. A PKM2 a sejtmagba transzlokálódik, ahol apoptózist indít be kaszpáz és Bcl-2 (B sejt limfóma 2: antiapoptotikus fehérje) független módon.⁸²

A TT-232 jelentős *in vitro* citosztatikus és citotoxikus hatással rendelkezett hatvan féle humán tumorsejten tesztelve. Az *in vitro* eredmények közül kiemelném, hogy a TT-232 mind hatóanyag érzékeny, mind pedig multidrog rezisztens (MDR) hepatocelluláris karcinómasejteken hatékonyan bizonyult *in vitro*.⁸⁷ *In vivo* körülmények között leghatékonyabbnak humán melanóma-, emlő-, és limfóma xenograftokkal szemben bizonyult. A peptid különböző tumortípusokkal szemben II-es fázisú klinikai vizsgálatokban is biztató eredményeket mutatott.^{88,89,90}

2.4 A konyhától a klinikáig: tumor prevenció és kezelés „természetes” úton

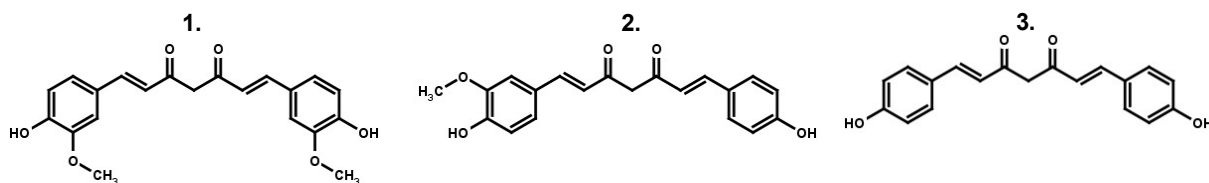
Az utóbbi években főleg az epidemiológiai kutatásokból kapott információknak köszönhetően, megnövekedett figyelmet kaptak a minket körülvevő élővilágból nyert természetes és egyéb az étrendünkben megtalálható vegyületek. A vizsgálatok ugyanis kimutatták, hogy a gyümölcs- és zöldségfogyasztás számos tumor típus kialakulásának kockázatát csökkentette. Néhány fitokémiai vegyület, különösképpen a flavonoidok és a kurkumin rendelkezik potenciális tumornövekedést gátló és apoptózist indukáló hatással, amely mind a betegségek megelőzésében, mind pedig a velük szembeni terápiában hasznosítható.⁹¹

Az elfogyasztott növényi táplálék bomlástermékei egyes mutagén anyagokkal szemben védelmet nyújtanak a vastagbél sejtekben. Így a megfelelő étrenddel megelőzhető a hazánkban csakúgy, mint a világon jelentős számú áldozatot szedő vastagbélrák és végbélrák.

A természetből nyert vegyületek a konvencionális kemoterápiás szerekkel kombinációban alkalmazva hasznosak lehetnek a kevesebb mellékhatással, nagyobb hatékonysággal járó tumorterápiában.

2.4.1 A fitoterapeutikum kurkumin

A *Curcuma longa* egy indiai fűszernövény, amely növény gyökértörzsét ledarálva kapjuk az indiai ételek sárga színét adó fűszert, a kurkumát. India sáfrányának, vagy a szegények sáfrányának is nevezett ételízesítőt régóta alkalmazzák az ayurvédikus gyógyászatban gyulladáscsökkentő tulajdonsága miatt. Maga a fűszerkivonat egy keverék, összetevői között megtalálható a három kurkuminoid (kurkumin: 77%, demetoxikurkumin: 18%, biszdemetoxikurkumin: 5%, 2. ábra), illóolajok, fehérjék, cukrok, valamint gyanták. A kurkumin a keverék elsődleges hatóanyaga.⁹²



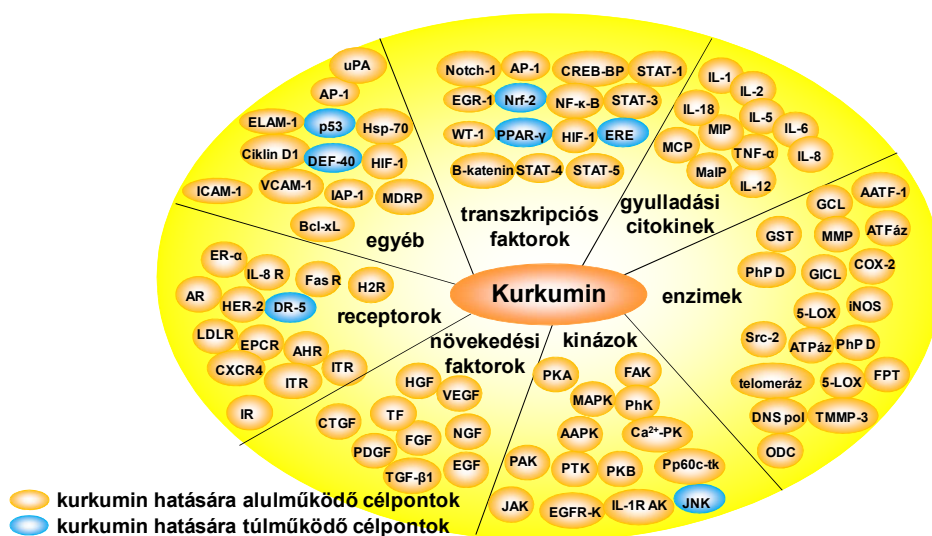
2. ábra: A kurkuma összetevői: 1. kurkumin, 2. demetoxi kurkumin, 3. biszdemetoxikurkumin

A kurkumin egy vízben gyakorlatilag oldhatalan lipofil polifenol, amely antioxidáns, antimikrobiális, gyulladáscsökkentő, antivirális, tumorelles, érképzést gátló hatással rendelkezik.

A hagyományos indiai gyógyászatban évezredek óta alkalmazott kurkuminra a modern orvoslásban is felfigyeltek, mint lehetséges gyógyszerhatóanyagra. Ha áttekintjük a kurkuminnal kapcsolatos tudományos irodalmat, akkor egyszerűbb felsorolni azokat a betegségeket, melyekkel szemben nem hatásos, vagy még nem próbálták ki. Ezért a teljesség igénye nélkül álljon itt néhány betegség, ami ellen alkalmazzák a kurkumint: reumatoid arthritis és egyéb ízületi bántalmak, gyomorfekély, emésztési zavarok, Alzheimer-kór, hasnyálmirigy gyulladás, bőrbetegségek: pszoriázis, neurodegeneratív betegségek, vesegyulladás, szklerózis multiplex, tüdő fibrózis, diabétesz, különböző tumoros megbetegedések. A kurkumin rendkívül biztonságos, akár napi 8 grammos dózisban is adható.^{93,94}

A kurkumin széles spektrumú alkalmazhatóságának oka, hogy számos gyulladásos folyamatban részt vevő molekuláris célponttal képes kölcsönhatni. Aktiválhat (túlműködést ill. alúlműködést okozva) transzkripciós faktorokat (NF- κ B, STAT3, AP-1, NRF-2, PPAR-c,

HIF-1), kinázokat (EGFR, ERK, JAK, MAPK), citokineket (TNF, IL, MIP, MCP), enzimeket (iNOS, GST, ATPáz), növekedési faktorokat (EGF, NGF, PDGF) (3. ábra). Ezáltal a kurkumin számos molekuláris és biokémiai kaszkádra van hatással.



3. ábra: A kurkumin molekuláris célpontjai

A kurkumin továbbá képes gátolni a tumorsejt proliferációját és túlélését. A kurkumin okozta sejthalál a sejthalál útvonalak beindításával és a növekedési/proliferációs útvonalak gátlásával áll összefüggésben. Hatását szelektíven a tumorsejtekben fejti ki.^{94,95}

A rákos betegségekkel foglalkozó kutatások megállapították, hogy a tumorok iniciációja (spontán vagy mutagén behatások okozta DNS mutációk létrejötte) és progressziója (az „elfajult” sejtek elszaporodása) olyan komplex folyamat, amelyben több jelátviteli útvonal is közrejátszik. Ez a megállapítás viszont arra enged következtetni, hogy ha van egy olyan hatóanyagunk amely képes több molekuláris célponttal is kölcsönhatásba lépni, akkor az jóval hatásosabb lesz, mint a használatban lévő egy célpontos tumorellenes hatóanyagok. Tehát a kurkumin multicélpontos tulajdonsága lehet a kulcs tumorellenes terápiás szerként való alkalmazásához. Emellett az sem elhanyagolható szempont, hogy a kurkumin jóval olcsóbb, mint az általában alkalmazott kemoterápiás hatóanyagok.^{95,96,97}

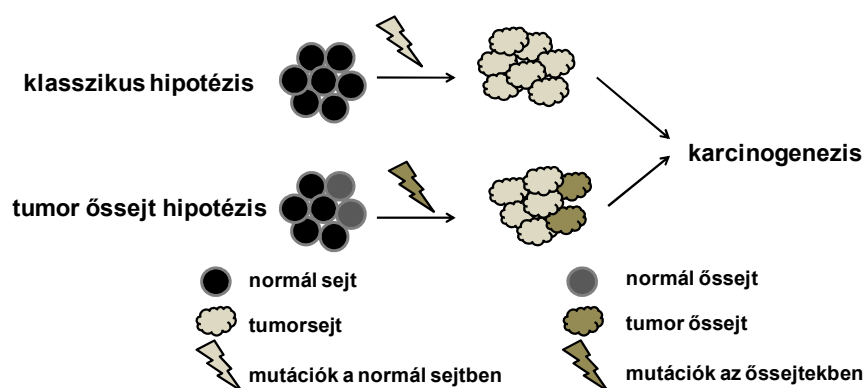
Azonban a kurkumin alkalmazhatóságát nagyban megnehezíti a gyors kiürülése a véráramból, illetve a gyomor-bélrendszerben és a májban lejátszódó gyors metabolizációja. Fő metabolitjai a kurkumin-szulfát és a kurkumin-glükuronid. A biohasznosíthatóságát vízzeloldékonyabb származékok, konjugátumok kialakításával, liposzómába zárva, foszfolipid komplex formájában vagy kombinált adagolásával növelhetjük.

Például a fekete borsban található alkaloid, a piperin amely *in vivo* humán vizsgálatban húszszorosára növelte a kurkumin biohasznosíthatóságát együttes adagolás esetén, mivel a

piperin gátolja a vérben a glükuronidizációt, és a kurkumin bélben történő lebomlását.^{96,98,99}

2.4.1.1 A kurkumin, mint tumor őssejt antikarcinogén

A tumor őssejt hipotézis állítása szerint a rákos megbetegedés kialakulásának egyik feltételezett oka, hogy a szöveti őssejtek, vagy a progenitor/elődsejtek normális, szorosan ellenőrzött önmegújítása kórosan szabályozódik (4. ábra).



4. ábra: A „klasszikus” és a „tumor őssejt hipotézis” a karcinogenezisben

(Dolgozatomban a tumor őssejt (cancer stem cell) kifejezést alkalmazom, amely szintén nem egy általánosan elfogadott meghatározás. Az irodalomban előfordul még a tumort iniciáló sejt (tumour initiating cell) vagy a tumor őssejtszerű sejt (cancer stem-like cell).
 Őssejt: az egyedfejlődés korai szakaszában megjelenő, de a felnőtt szervezetben is folyamatosan jelenlévő, korlátlan számú osztódásra és önmegújulásra képes, nem specializálódott sejtek.

Progenitor (elődsejt): már csak a szöveti sejtípusok néhány szűkebb, vagy egyetlen formáját képesek létrehozni. Mind a multipotens őssejtek, mind a progenitor sejtek képesek arra az önmegújításra, amely megkülönbözteti az őssejteket a differenciálódott testi sejtektől.)

Ezért a hibásan működő sejtpopulációk számának csökkentése és a tumor kiújulásának megakadályozása érdekében az önmegújítás képességét kell akadályozni. Az elméletet alátámasztja, hogy számos tumorszövetben megtalálható olyan sejtpopuláció, amely az őssejtek tulajdonságait hordozza. Ezek a sejtek képesek az önmegújításra, differenciált utódokat hoznak létre és rezisztenssé válnak a kemoterápiás szerekekkel szemben.

Bár a kutatók között nincs konszenzus a tumor őssejt hipotézis helyességét illetően, ha az elmélet helytálló, az őssejtek önmegújító útvonalait (wnt, notch, hedgehog) célzó stratégiák megfelelő módszerek lehetnek a tumorok kialakulásának és/vagy újra megjelenésének megelőzésére.

A 2.4.1 fejezetben leírtak alapján a kurkumin számos jelátviteli útvonalba avatkozik

bele, köztük az őssejtekkel kapcsolatba hozhatókba is. A jelenlegi kutatások szerint ezek közül a kurkumin a wnt, a notch, a hedgehog, a STAT (szignál transzdukciós és aktivátor faktor) és az interleukin-8 (IL-8) jelátviteli útvonalakba avatkozik bele, ezáltal változásokat okozva a tumor őssejtek funkciójában és tulajdonságaiban.^{98,100,101}

2.4.2 Rövid szénláncú zsírsavak (SCFA) szerepe az egészséges bélflórában

Megfigyelték, hogy a táplálkozási szokásokat és a vastagbélbetegségeket gyakoriságát összevetve, vagyis az elfogyasztott táplálék összetevői és a bélbetegségek között összefüggés van.¹⁰² Az már régóta ismert, hogy a rostban gazdag táplálék segíti az emésztésünket, bővebb, gyorsabban ürülő székletet eredményezve. A túl lassú perisztaltika esetén a salakanyagok visszamaradnak a belekben, rothadásnak indulnak és belőlük a vastagbél nyálkahártyáját irritáló karcinogén vegyületek szabadulhatnak fel. A rostok segítségével viszont ezek gyorsabban ürülnek a szervezetből, kisebb esélyt adva a karcinogén, promóter vegyületek és a bélhámsejtek kölcsönhatására.

A zöldségekből, gyümölcsökből és egyéb növényi táplálékból származó rostanyagok valószínűleg nem csak ez által fejtik ki pozitív hatásukat. Az emésztésre gyakorolt jótékony hatás mellett úgynevezett probiotikus aktivitással is rendelkeznek, vélhetően a bélrendszerben fermentáció útján belőlük felszabaduló antioxidánsok sejtvédő hatásai következtében.^{103,104}

A vastagbél fiziológiájában fontos védelmi szerepet betöltő vegyületek azok a kettő-hat szénatomos monokarbonsavak, melyek az élelmi rostok és rezisztens keményítők anaerob bakteriális fermentációjának melléktermékei. Az élelmi rostok változatlanul érik el a béltraktust, ahol az elfogyasztott tápláléktól függően a következő fő metabolitokra bomlanak: ecetsav, propionsav, vajsav, valeriansav, kapronsav (hexánsav), és elágazó SCFA-ak, mint az izovajsav és az izovaleriansav. Ezen SCFA-ak, különösen a vajsav, gátolják a tumorsejtek növekedését, fokozzák a differenciálódásukat, továbbá apoptotikus folyamatokat indítanak be. Az egészséges „nem transzformálódott sejtek túlélését segíti, az átalakult, „transzformálódott” sejtekét viszont csökkenti. A vajsav hatását főleg specifikus gének kifejeződésének szabályozásával fejtik ki hiszton deacetiláz inhibitor (HDACi) aktivitásával. A hisztonok acetil csoportjának (lizinek ¹⁵N-acetil-csoportja) lehasítása révén a nukleoszómában a hisztonok és a DNS között erősebb kötés alakul ki. Így az enzim gátlásával a nukleoszómák hiperacetilált, nyitottabb állapota jön létre, amely hozzáférhetőbbé teszi a DNS-t a transzkripció faktorok számára, ami megnövekedett transzkripciót eredményez. Következésképpen a vajsav változásokat indít be a génexpresszióban.¹⁰⁵

A vajsav glutathion S-transzferáz (GST) aktivitása révén segíti az egészséges bélsejteket

megszabadítani az étkezéssel a szervezetünkbe kerülő karcinogén vegyületektől is. A GST-ok olyan biotranszformációs enzimek, melyek számos karcinogén vegyületet (pl.: táplálék eredetű 4-hidroxi-2-nonenál, benzopirének) detoxifikálnak. A vajsav a GST-ok és más hatóanyag metabolizáló enzimek működését indítja be.^{106,107}

A vajsav továbbá a Bak proapoptotikus fehérje expressziójának növelésével és/vagy a p26-Bcl-2 antiapoptotikus fehérje szintjének csökkentésével apoptózist indukál különböző humán tumorsejtekben (pl. HT-29, HL-60, stb).^{108,109}

Összegezve, a vajsav szabályozza a bélfalat borító epiteliális sejtek osztódását, segíti az egészséges sejtek túlélését, ugyanakkor gátolja a tumorsejtek növekedését.

A vajsav mellett keletkező egyéb fermentációs termékek növelik tumorelles hatását. Beyer-Sehlmeyer és mtsai. kimutatták, hogy *in vitro* körülmények között a fermentációs keverékek növelték a vajsav antiproliferatív hatását, nem változtatták meg a GST enzimre gyakorolt befolyását, valamint megakadályozták a tumorsejtek citosztatikumokkal szemben kialakuló rezisztenciáját.¹¹⁰

Az ismertetett irodalmi előzmények alapján a rövid szénláncú zsírsavak fontos építőkövei lehetnek az irányított tumorterápiában alkalmazott hatóanyag szállító rendszereknek. Ezt a feltevést doktori munkám során megkísértem igazolni.

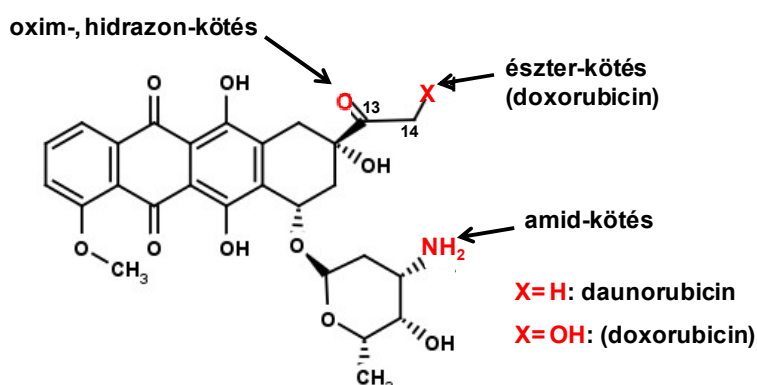
2.5 Antraciklinek

Az antraciklin antibiotikumok családjának tagjai a *Streptomyces peucetius* var. *caesius* aktinobaktériumtól származó tumorelles kemoterápiás szerek. Az első azonosított antraciklin a daunorubicin (daunomicin, Dau) volt (5. ábra).¹¹¹ A daunorubicint hamarosan számos származéka követte, melyek közül terápiás jelentőséggel legfőképpen a doxorubicin (adriamicin) (5. ábra) és az epirubicin bír.

Az antraciklinek terápiás hatása több mechanizmusra vezethető vissza. A tumorsejtek sejtciklusának megállításával apoptózist indítanak be. Ezt leginkább a DNS-sel kialakított erős kölcsönhatás útján érik el, mivel képesek interkalálódni a bázispárok közé és így gátolni az örökítőanyag átírását. A topoizomeráz II enzim inhibitoraként ugyancsak gátolják a transzkripciót. Reaktív oxigéngyökök képzésével is hozzájárulnak a tumorelles aktivitásukhoz, bár ezt leginkább a toxicitásukkal (pl.: kardiotoxicitás) hozzák összefüggésbe.^{112,113,114} Az antraciklinek családja az egyik leghatékonyabb tumorelles gyógyszerce csoport, azonban önmagukban nem szelektívek, a fentebb említett hatások az egészséges sejtekben is érvényesülnek, úgy, mint immunszuppresszió, a gyomor-bél nyálkahártya károsodás okozta toxikus mellékhatások (hasmenés, hányás, étvágytalanság),

valamint kardiotoxicitás.^{115,116}

A káros mellékhatások elkerülése, az alkalmazott dózis emelése és a rezisztencia kikerülése érdekében mind a daunorubicint, mind a doxorubicint peptidekhez, fehérjékhez és egyéb molekulákhoz konjugálták, vagy liposzómába zárták. Az alkalmazott hordozó molekulák kétfélék voltak: célfelismerő egységet nem tartalmazók (pl. HPMa és EAK szintetikus polimerek)^{117,118} és célfelismerő egységet (pl.: GnRH, szomatosztatin) tartalmazó vegyületek.^{37,72,117,120} Az antraciklinek az irányító egységekhez különböző kémiai kötésekkel keresztül kapcsolhatók. A daunorubicinnek két, a doxorubicinnek három konjugációra alkalmas funkciós csoportja van (5. ábra).



5. ábra: A daunorubicin és a doxorubicin szerkezete és a kialakítható kötés típusok

Mind a daunorubicin, mind a doxorubicin konjugálható oxim-, hidrazon-kötéssel (13-as C-atom), vagy amid-kötéssel keresztül a daunozamin részlet aminocsoportjának felhasználásával. Az amid-kötés viszonylag stabil, könnyen kialakítható és a konjugátum egyszerűen tisztítható. Azonban a citotoxikus hatás csökkenésével járhat, kivéve, ha olyan molekularészleten keresztül kapcsoljuk a Dau aminocsoportját a hordozóhoz, amely konstrukcióból a szabad hatóanyag felszabadulhat.^{37,121,122} A hidrazon-kötéssel kialakított konjugátumok kitermelése általában alacsony, illetve a kötés savlabilitása miatt, a vegyület tisztítása is problémát okoz. A szintézis és a vérárambeli stabilitás szempontjából legmegfelelőbb kapcsolat az oxim-kötés lehet, amely széles pH tartományban (pH=3-9) stabil^{123,124} és az így kialakított konjugátum könnyen tisztítható. Ugyanakkor még nem sikerült kimutatni, hogy ebből a konstrukcióból a hatóanyag felszabadul-e, de a metabolit kötődése a DNS-hez igazolt.¹²⁵

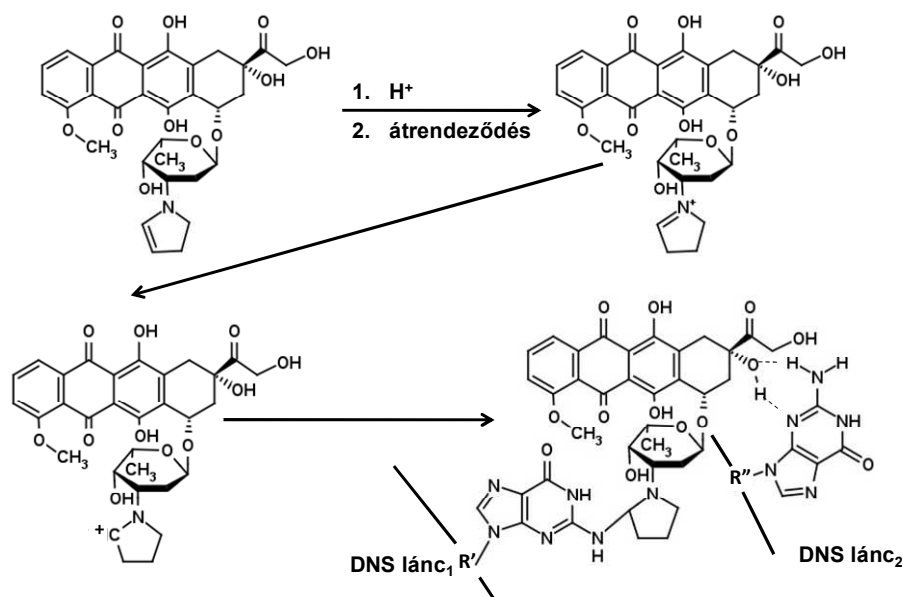
2.5.1 2-Pirrolino-doxorubicin

Doktori munkám során hatóanyagként a daunorubicin és a kurkumin mellett a 2-pirrolino-doxorubicin mintájára előállított vegyületet, a 2-pirrolino-daunorubicint is

alkalmaztam. Mivel a 2-pirrolino-daunorubicint korábban még nem vizsgálták, ezért biológiai tulajdonságait, feltételezett hatásmechanizmusát a doxorubicin analógnak mutatom be.

Az antraciklin antibiotikum doxorubicin széleskörben alkalmazott, rendkívül hatásos tumorelles gyógyszer.¹²⁶ Klinikai alkalmazása azonban korlátokba ütközik, ugyanis súlyos mellékhatásokkal (kardiotoxicitás, immunszuppresszió, multidrog rezisztencia kialakulása) rendelkezik. Ezért számos próbálkozás irányult az eredeti molekula fejlesztésre. Az optimalizálási stratégiák közé tartozik a hatóanyag formulázásában bevezetett újabb módszer (liposzómális gyógyszerformulázás: Doxil¹²⁷) vagy a doxorubicinból kiinduló származékképzés. Az e célból készült több száz analóg közé tartozik a 2-pirrolino-doxorubicin is.

A 2-pirrolino-doxorubicinből enyhén savas közegben reaktív immónium ion képződik. Mivel az immóniumcsoport erősen elektrofil, ezért a DNS molekulával erős kovalens kötés kialakítására képes (6. ábra), ami a vegyület citosztatikus aktivitásának drámai növekedését okozza.



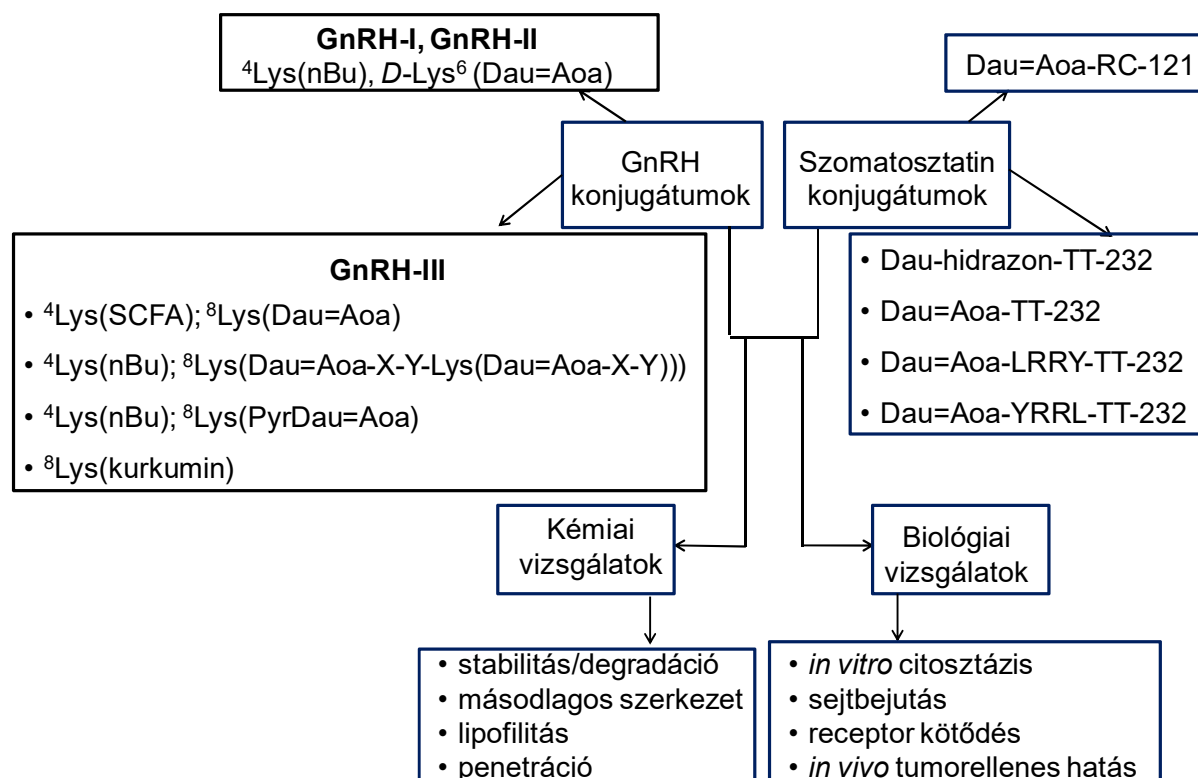
6. ábra: Reaktív immónium kation képződése és a 2-pirrolino-doxorubicin-DNS addukt kialakulása

Ezenfelül az eredeti molekulához képest jóval kevésbé kardiotoxikus és a vele szemben kialakuló multidrog rezisztencia esélye is jóval alacsonyabb. *In vitro* körülmények között a 2-pirrolino-doxorubicin 500-1000-szer hatékonyabb, mint a doxorubicin.¹²⁶ *In vitro* citosztatikus hatását a doxorubicinhez hasonlóan több szinten fejti ki: a DNS kettősláncába beépülve mind nem-kovalens (interkaláció) mind pedig kovalens kötést kialakítva (láncközi keresztkötések képzése, topoizomeráz inhibitor), valamint helikáz gátló tulajdonsága révén.^{128,129}

3 Célkitűzések

Doktori munkám célja az irányított tumorterápiában alkalmazható tumorellenes hatóanyagot és különböző peptidhormon analógokat tartalmazó új biokonjugátumok előállítása, kémiai és biológiai vizsgálata volt. Irányító molekulaként önmagukban is tumorellenes hatással rendelkező GnRH és szomatosztatin analógokat terveztem alkalmazni, hatóanyagként pedig az antraciklinek családjába tartozó daunorubicint és az abból előállított 2-pirrolino-daunorubicint, valamint a fito-polifenol kurkumint.

A következő ábrán röviden összefoglalom az alább részletesen kifejtett céljaimat.



Az ábrán feltüntetett konjugátumok szintézisét és vizsgálatait az alábbiakban pontokba szedve fejtem ki részletesen.

1. Négyes helyzetben zsírsav láncokkal módosított daunorubicin-GnRH-III biokonjugátumok

Célul tűztem ki megnövekedett enzimstabilitású, sejtbejutási képességű, tumorellenes hatású, a 4-es helyzetben szerin helyett lizint tartalmazó GnRH-III analógok előállítását, amelyekben ezen lizin ε-aminocsoportját különböző lánc hosszúságú zsírsavakkal szándékoztam acilezni. A cél elérése érdekében az alábbi szintézislépéseket és vizsgálatokat terveztem:

- a 4-es helyzetben zsírsavakkal módosított, 8-as helyzetben aminooxiacetilezett lizint

tartalmazó GnRH-III származékok szintézise;

- a peptidek daunorubicint tartalmazó konjugátumainak előállítása oxim-kötés kialakításával;
- a biokonjugátumok stabilitásának vizsgálata sejttenyésztő médiumban és α -kimotripszin hatására illetve degradációjának tanulmányozása patkány máj lizoszóma preparátum jelenlétében;
- a biokonjugátumok *in vitro* citosztatikus hatásának megállapítása HT-29 humán vastagbél adenokarcinóma, MCF-7 humán emlő adenokarcinóma, HepG2 humán hepatocelluláris máj karcinóma és HL-60 humán promielocitás leukémia sejteken;
- a biokonjugátumok sejtbejutási képességének meghatározása HT-29 és MCF-7 sejteken;
- a biokonjugátumok másodlagos szerkezetének meghatározása CD spektroszkópiával a konjugátumok szerkezet-hatás összefüggésének céljából;
- a biokonjugátumok lipofilitásának meghatározása;
- a biokonjugátumok penetrációs képességének vizsgálata membrán modellben;
- a kiválasztott konjugátum humán GnRH-I receptorhoz való kötődésének vizsgálata, mivel sem a GnRH-III, sem pedig annak receptora nem található meg az emberi szervezetben;
- az *in vitro* vizsgálatok eredményei alapján kiválasztott leghatásosabb konjugátum *in vivo* tumorelles hatásának vizsgálata ortotopikus HT-29 humán vastagbél-tumor modell alkalmazásával.

2. Négyes helyzetben vajsavval módosított két daunorubicint tartalmazó GnRH-III biokonjugátumok

A tumorelles hatás fokozása érdekében 2 molekula daunorubicint valamint vajsavat tartalmazó GnRH-III származékok előállítását és analízisét tűztem ki célul, az alábbiakban felsorolt szintézisek valamint kémiai és biológiai vizsgálatok alkalmazásával.

- 4-es pozícióban vajsavval acilezett lizint és a 8-as pozícióban a lizin ϵ -aminocsoportján újabb lizinnel módosított GnRH-III származék szintézise, melyhez két aminooxiacetyl csoport beépítését követően lehetőség van két hatóanyag molekula kapcsolására az irányító molekulához;
- 2 molekula daunorubicin kapcsolása oxim-kötés kialakításával közvetlenül vagy GFLG katepszin B enzimre érzékeny spacer szekvencián, valamint az oldékonyság növelés céljából alkalmazott etilén-glikol származékon keresztül;
- a vegyületek oldékonyságának vizsgálata;
- a biokonjugátumok degradációjának vizsgálata patkány máj lizoszóma jelenlétében;

- a biokonjugátumok *in vitro* citosztatikus hatásának meghatározása HT-29 és MCF-7 sejteken.

3. Négyes helyzetben vajsavval módosított 2-pirrolino-daunorubicin-GnRH-III biokonjugátum

A kutatócsoportban előállított 2-pirrolino-daunorubicin származék beépítését terveztem 4-es pozícióban vajsavval acilezett lizint tartalmazó GnRH-III analógba, hogy megvizsgáljam, a daunorubicin származék oxim-kötésen keresztül kapcsolva is hatásosabb-e, mint az eredeti vegyület, ahogyan ez a doxorubicin és a 2-pirrolino-doxorubicin esetében tapasztalható észter-kötésű konjugátumok esetén. Ennek érdekében a következő lépéseket terveztem:

- 4-es pozícióban vajsavval acilezett lizint tartalmazó GnRH-III előállítását, melyben a 8-as pozícióban található lizin ϵ -aminocsoportja aminooxiacetil részleten keresztül a daunorubicinnél hatékonyabb 2-pirrolino-daunorubicin kapcsolódik oxim-kötésen keresztül;
- A biokonjugátum *in vitro* citosztatikus hatásának meghatározását HT-29 és MCF-7 sejteken.

4. Négyes helyzetben vajsavval módosított daunorubicin-GnRH-I és daunorubicin-GnRH-II biokonjugátumok

4-es pozícióban vajsavval acilezett lizint és a 6-os helyzetben oxim-kötéssel daunorubicint tartalmazó $[D\text{-Lys}^6]\text{GnRH-I}$ és $[D\text{-Lys}^6]\text{GnRH-II}$ konjugátumok előállítását tűztem ki célul, annak érdekében, hogy megvizsgálhassam, ezen vegyületek esetén is növeli-e a konjugátumok aktivitását a $^4\text{Ser} - ^4\text{Lys(nBu)}$ csere, mint ahogyan azt a GnRH-III analógnál tapasztaltam. Ennek érdekében a GnRH-I és GnRH-II származékokat tartalmazó konjugátumok *in vitro* citosztatikus hatását terveztem meghatározni HT-29 sejteken.

5. Irányított tumorterápiában alkalmazható kurkumin tartalmú vegyület előállítása

Kurkumin tartalmú GnRH-III konjugátum előállítását tűztem ki célul klikk kémia segítségével. Ennek céljából a következő szintézislépéseket terveztem:

- 8-as pozícióban azid csoportot tartalmazó GnRH-III analóg előállítása;
- kurkumin-monoalkin származék előállítása;
- a hatóanyag molekula kapcsolása a GnRH-III származékhoz klikk-kémia segítségével.

6. Daunorubicin tartalmú szomatosztatin analóg biokonjugátumok

Szomatosztatin analógokat, mint célbajuttató egységeket tartalmazó konjugátumok szintézisét és vizsgálatát terveztem, azért, hogy tanulmányozzam a kiválasztott szomatosztatin származékok megőrizték-e tumorelles hatást N-terminálisuk módosítása ellenére,

valamint, hogy a peptidek önmagukban kifejtett hatása hatóanyag tartalmú konjugátum formájában növelhető-e. Ehhez a következő lépéseket tűztem ki célul:

- aminosxiacetil-csoporttal módosított RC-121 származék előállítása;
- az Aoa-RC-121 konjugálása daunorubicinhez oxim-kötés kialakításával.
- szomatosztatin agonista heptapeptid TT-232, valamint YRRL és LRRY katapszin B enzimmel hasítható távtartó egységgel (spacer) módosított YRRL-TT-232 és LRRY-TT-232 célbajuttató molekulákat és oxim-kötésben valamint hidrazon-kötésben daunorubicin hatóanyagot tartalmazó biokonjugátumok előállítása;
- *in vitro* citosztatikus hatásuk vizsgálata HT-29 sejteken.

7. Különböző célbajuttatóegységet tartalmazó konjugátumok alkalmazása kombinációs kezelésekben

A korábbi vizsgálatokban leghatékonyabbnak bizonyult GnRH-III (GnRH-III(⁴Lys(nBu), ⁸Lys(Dau=Aoa))), illetve szomatosztatin analógot (Dau=Aoa-LRRY-TT-232)) tartalmazó konjugátumok alkalmazását terveztem kombinációs kezelésekben alkalmazni különböző konstrukciókban HT-29 sejteken MTT-teszt segítségével.

4 Alkalmazott módszerek

A fejezetben röviden összefoglalom a munkám során alkalmazott szintetikus és analitikai módszereket. A szerkezet vizsgálati, valamint az *in vitro* és *in vivo* biológiai módszereket az Eredmények és Kísérleti rész adott fejezeteiben ismertetem röviden.

4.1 Szilárdfázisú peptidszintézis (SPPS)

Doktori munkám során peptid irányító molekulákat tartalmazó biokonjugátumokat állítottam elő, ezért alapvető fontosságúnak tartom, hogy röviden bemutassam a szilárdfázisú peptidszintézis alapjait.

A peptidek kémiai, nem fermentációval történő szintézisének két fő módja van: az oldatban végzett és a szilárdfázisú peptidszintézis. Munkám során szilárdfázisú peptidszintézissel állítottam elő a különböző GnRH és szomatosztatin származékokat, ezért ezt a módszert ismertetem.

4.2 A módszer kialakulása és elve

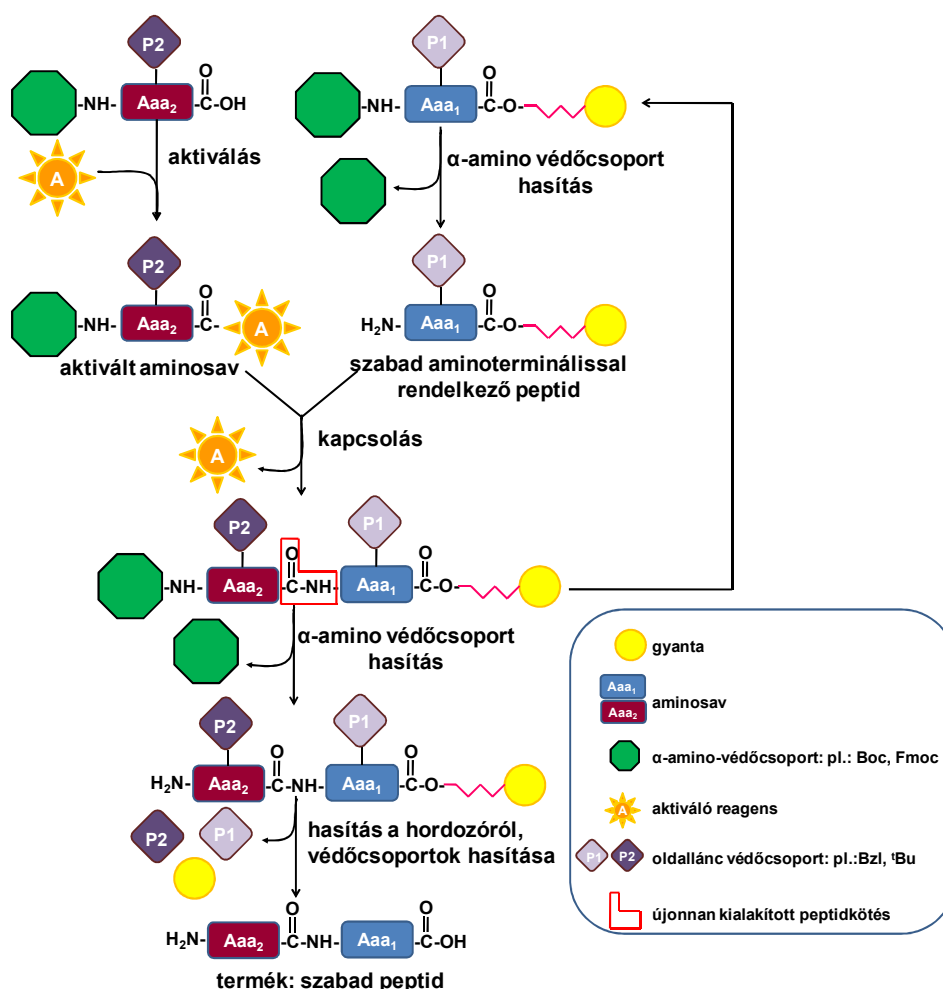
Két alternatív eljárás alkalmazható a peptidek szilárd hordozón történő felépítésére. Az elterjedtebb, és az általam is használt módszert a lépésenkénti (stepwise) szintézist Bruce Merrifield amerikai biokémikus fejlesztette ki, és publikálta 1963-ban. Merrifield a módszer kifejlesztéséért 1984-ben Nobel-díjban részesült.¹³⁰ A másik eljárás a konvergens szilárdfázisú peptidszintézis (CSPPS), amely során védett (esetleg részlegesen védett) peptid fragmenseket kapcsolnak össze szilárd hordozón.¹³¹

A lépésenkénti módszer azon az ötleten alapszik, hogy a peptidláncot lépésenként építjük fel, míg a lánc egyik vége a szilárd hordozóhoz van kötve. A szintézis folyamán az egyre növekvő peptidlánc egy oldhatatlan, funkciós csoportokkal vagy funkcionális linkerekkel ellátott polimer hordozóhoz van kovalensen kötve. Ezáltal az épülő peptidlánc a szilárd hordozóval együtt egyszerűen és gyorsan kiszűrhető, a reaktáns felesleg és a köztitermékek mosással könnyen eltávolíthatóak az oldatfázisú szintézis módszere során alkalmazott kristályosítással, extrakcióval ellentétben. Az oldatban végzett peptidszintézis során felmerülő további nehézségek, mint például a peptidlánc növekedésével kialakuló oldékonysági probléma kiküszöbölésére ugyancsak alkalmas a technika, így a peptidek és kisebb fehérjék laboratóriumi előállítására ez lett az általános módszer. Az eljárás nemcsak leegyszerűsíti, de nagymértékben meg is gyorsítja a szintézist, sőt a SPPS automatizálható is. Viszont az oldatfázisú szintézissel ellentétben csak a szintézis végén van mód az elkészült

peptid tisztítására és izolálására. Emiatt szükséges, hogy a szintetikus lépések hozama kb. 100%-os legyen, amit úgy érhetünk el, hogy mind az alkalmazott aminosavszármazékokból, mind a kapcsolószerekből a gyantakapacitásra számolva 3-10 ekvivalenst használunk. Azonban ilyen nagyarányú feleslegeknél az aminocsoportnál kevésbé nukleofil oldallánc funkciós csoportok is reagálhatnak. Ezen oknál fogva olyan aminosavszármazékokat kell alkalmaznunk a SPPS során, melyeknek oldallánc funkciós csoportjai is védettek (állandó védőcsoport), ami viszont az alkalmazott feleslegekkel együtt költségessé teszi a módszert.

Mivel a peptidláncokat a riboszómális fehérje szintézissel ellentétben a C→N-terminális irányban építjük fel, ezért a SPPS általános eljárása a karboxilcsoportján aktivált és aminocsoportján védett aminosavszármazék kapcsolásának és az α-aminocsoporton lévő védőcsoport (átmeneti védőcsoport) szelektív eltávolításának ismétlődő ciklusából áll, amíg meg nem kapjuk a kitűzött szekvenciájú peptidet. A szintézis általános menetét a 7. ábrán foglaltam össze.

A peptidet a szintézis végén a gyantáról lehasítjuk, lehetőleg úgy, hogy egy lépésben eltávolítsuk az oldallánc funkciós csoportokon található védőcsoportokat is.



7. ábra: A lépésenkénti szilárdfázisú peptidszintézis folyamata

4.2.1 A lépésenkénti szilárdfázisú peptidszintézis két általánosan alkalmazott stratégiája

A lépésenkénti szilárdfázisú peptidszintézisben a két legelterjedtebb módszer a Boc/Bzl és az Fmoc/^tBu stratégia.¹³²

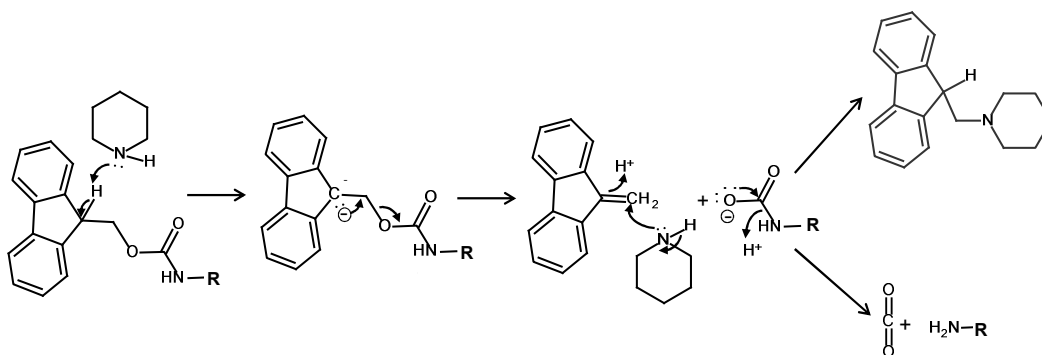
1. Boc/Bzl stratégia: amelyben az aminosavszármazékok α -aminocsoport védelmére *tert*-butiloxikarbonil-csoportot, míg az oldalláncok védelmére főleg Bzl-típusú védőcsoportokat használunk.¹³³

2. Fmoc/^tBu stratégia: amelyben az aminosavszármazékok α -aminocsoport védelmét 9-fluorenilmtoxikarbonil-csoport látja el, az oldallánc védőcsoportok pedig többnyire ^tBu-típusúak.¹³⁴

A Boc/Bzl módszer hátránya, hogy a savas közegben oxidációra és alkileződésre érzékeny aminosavakat (Trp, Met, Cys, Tyr) tartalmazó peptidszekvenciák szintézisére csak korlátozottan és megfelelő körültekintéssel („gyökfogók”, redukálószer) alkalmazható.¹³⁵ Ilyen esetekben a következő pontban bemutatott Fmoc/^tBu stratégia választása az indokolt. Mivel mind a GnRH, mind pedig a szomatosztatin származékai tartalmazzák a fentebb felsorolt érzékeny aminosavakat, ezért a doktori munkám során a peptideket Fmoc/^tBu stratégiával állítottam elő.

4.2.1.1 Fmoc/^tBu stratégia

A módszer során az aminosavszármazékok α -aminocsoportjait Fmoc (9-fluorenilmtoxikarbonil) csoport védi, amely bázisokkal (elsősorban szerves szekunder aminok pl: piperidin: 8. ábra) hasítható.

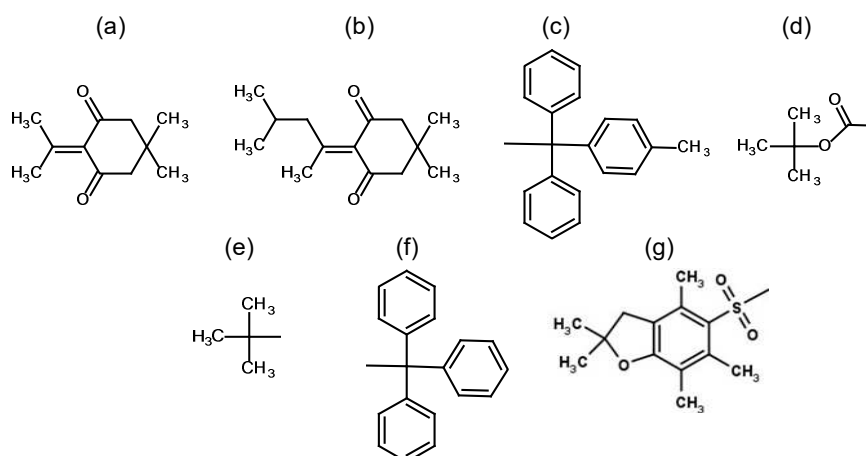


8. ábra: Fmoc védőcsoport hasításának mechanizmusa

Hasító elegyként 2% piperidin-2% DBU (1,8-diazobicyklo(5.4.0)-undek-7-én) / DMF elegye használható gyorsan és hatékonyan. Alkalmazása csökkenti az enantiomerizáció lehetőségét és térbeli gátlás esetén is hatékonyabb, mintha a 20-50% piperidin/DMF eleggyel

hasítanánk. Az Fmoc-csoport savakkal szemben stabil. A végső savas hasítás a Boc/Bzl technikánál alkalmazott hidrogén-fluoridnál jóval enyhébb körülmények között valósítható meg, mivel nem szükséges savra olyan stabil peptid-gyanta kötést kialakítani. Az aminosavak oldalláncát pedig főleg ^tBu és Trt típusú csoportok védik. A már említett oxidációra, alkileződésre hajlamos aminosavak mellékreakciók nélküli beépítése mellett a módszer alkalmas védett peptidok szintézisére is.¹³⁶

A teljesség igénye nélkül, csak a munkám során alkalmazott védőcsoportokat mutatom be az alábbi ábrán:



9. ábra : Az Fmoc technikánál alkalmazott oldallánc védőcsoportok: Lys oldallánc védelmére: (a) 1-(4,4-dimetil-2,6-dioxo-ciklohex-1-ilidén)etil (Dde), (b) 1-(4,4-dimetil-2,6-dioxo-ciklohex-1-ilidén)-3-metil-butil (ivDde), (c) 4-metil-tritil (Mtt), (d) *tercier*-butiloxikarbonil (Boc) (e): Asp, Ser, Thr, Tyr oldallánc védelmére: *tercier*-butil (^tBu); (f) His, Cys oldallánc védelmére: tritil (Trt); (g) Arg oldallánc védelmére: 2,2,4,6,7-pentametildihidro-benzofurán-5-szulfonil (Pbf)

4.2.1.2 Szilárd hordozó

A peptidszintézis során finomszemcsés polimer hordozót alkalmazunk, amely felületén és belsejében olyan funkciós csoportok vannak, amelyek lehetővé teszik, hogy a szemcsékhez aminosavakat vagy más vegyületeket kapcsolhassunk kovalens kötéssel. Leggyakrabban sztírol-divinilbenzol (1-2% 1,4- vagy 1,2-divinilbenzol) kopolimert alkalmazunk, melyet linkerekkel módosítanak attól függően, hogy milyen peptidet akarunk előállítani és milyen módszerrel.

A szilárd hordozóknak számos elvárásnak kell megfelelnie:

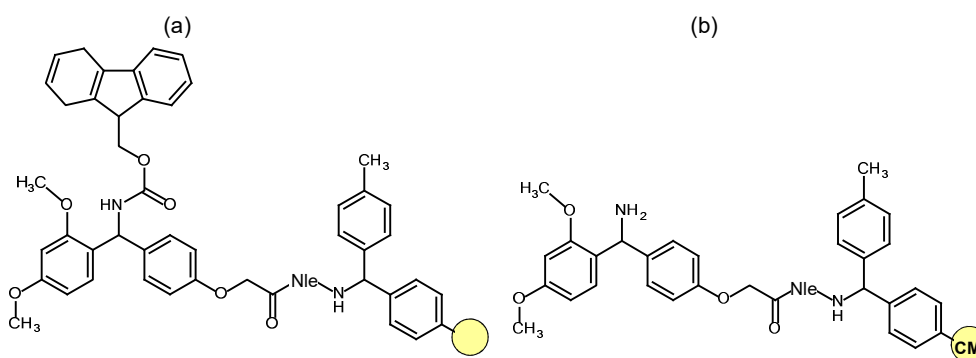
1. tartalmazzon funkcionálizálható részletet, azaz alkalmas legyen az első aminosav felkapcsolására;
2. stabil legyen mind a fizikai (keverés), mind a kémiai behatásokkal szemben, ne

reagáljon az alkalmazott reagensekkel, oldószerekkel és a peptidlánccal;

3. ne tartalmazzon szennyeződések;
4. jól duzzadjon az alkalmazott oldószerben, hogy az épülő peptidlánc, az oldószerek és a reagensek számára jól hozzáférhető legyen;
5. a gyanta polimer és a peptid közötti kötés stabil legyen, amíg a szintézis tart, de a kötés a szintézis végén hatékonyan hasítható legyen.

Az Fmoc/^tBu szintézis során az átmeneti védőcsoport hasítása bázissal történik, ezért olyan típusú gyantákat fejlesztettek ki, amelyekről a peptid már gyenge savak hatására lehasad. Ilyenek például a következők: hasítás után a C-terminálison szabad karboxilcsoportot eredményező Wang gyanta (4-benziloxibenzilalkohol)¹³⁷, 2-klórritil-klorid gyanta¹³⁸, és a Sasrin gyanta (2-metoxi-4-alkoxibenzil alkohol)¹³⁹. valamint a hasítást követően amid terminálist eredményező Rink-Amid gyanta (4-(2',4'-dimetoxi-fenil-Fmoc-aminometil)-fenoxi)¹⁴⁰ és a nagyobb savstabilitású Rink Amid MBHA (4-(2',4'-dimetoxi-fenil-Fmoc-aminometil)-fenoxiacetamido-norleucil-MBHA) gyanta.¹⁴⁰

A felsorolt gyanta típusoknak polietilén-glikolt (PEG) tartalmazó változatai is ismertek. Ezek számos előnnyel rendelkeznek: kitűnő nyomás stabilitás; remek duzzadó tulajdonságok (akár vízben is); magas diffúziós arány; számos funkciós csoporttal ellátott változata létezik; alacsony a gyantakapacitásuk (0,2-0,6 mmol/g), ezáltal jól alkalmazhatóak aggregálódó peptidek szintézisére és gyantán történő ciklizálásra, valamint fragmenskondenzációra. A munkám során is alkalmazott ChemMatrix gyanta család, teljesen PEG alapú. Különbözőképpen funkcionizált típusai amid- és karboxil C-terminálisú peptidek előállítására is alkalmasak.¹⁴¹ A 10. ábrán az általam használt gyantatípusokat tüntettem fel.

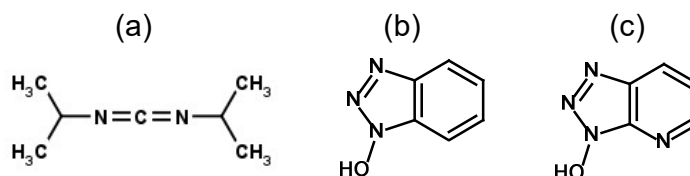


10. ábra: (a) Rink Amid MBHA gyanta (b) Rink Amid ChemMatrix gyanta

4.2.2 Kapcsolási eljárások

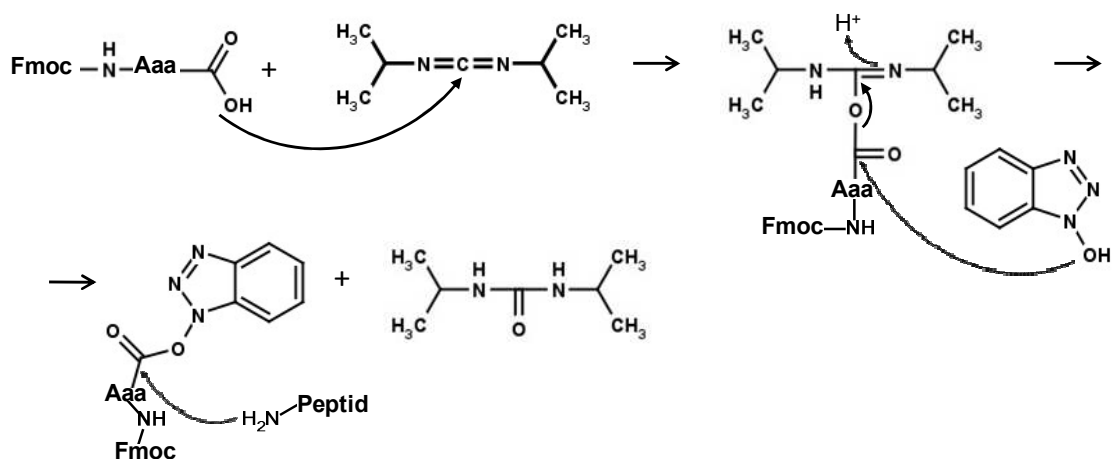
A szintézis során a ciklus állandó eleme a peptidkötés kialakítása, melyet a gyantához kötött szabad N-terminális aminosav vagy peptid valamint az aminosocportján védett, és

karboxilcsoportján aktivált aminosavszármazék között alakítunk ki. Az aktiválás és a kapcsolás leggyakrabban *in situ* történik kapcsolóreagensek segítségével. A leggyakrabban alkalmazott reagensek a karbodiimidek (pl.: DIC: *N,N'*-diizopropilkarbodiimid 11. ábra) és a HOXt hidroxibenztriazol származékok (pl.: HOBt: 1-hidroxibenztriazol, HOAt: 1-hidroxi-7-aza-benztriazol 11. ábra).¹⁴²



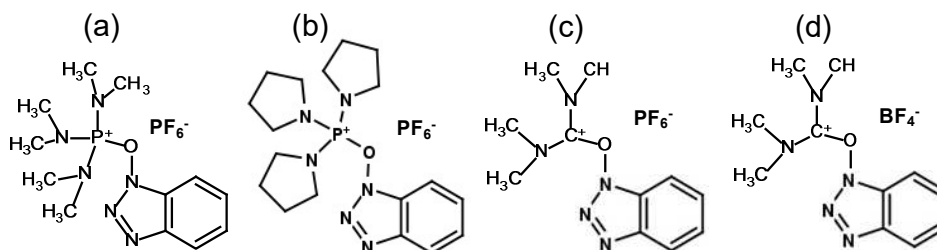
11. ábra: a: DIC; b: HOBt, c: HOAt

Ezen reagensekkel képzett *in situ* aktívészter kialakulását a 12. ábrán ismertetem.



12. ábra: Az *in situ* aktívészter kialakítása és reakciója a peptidlánccal

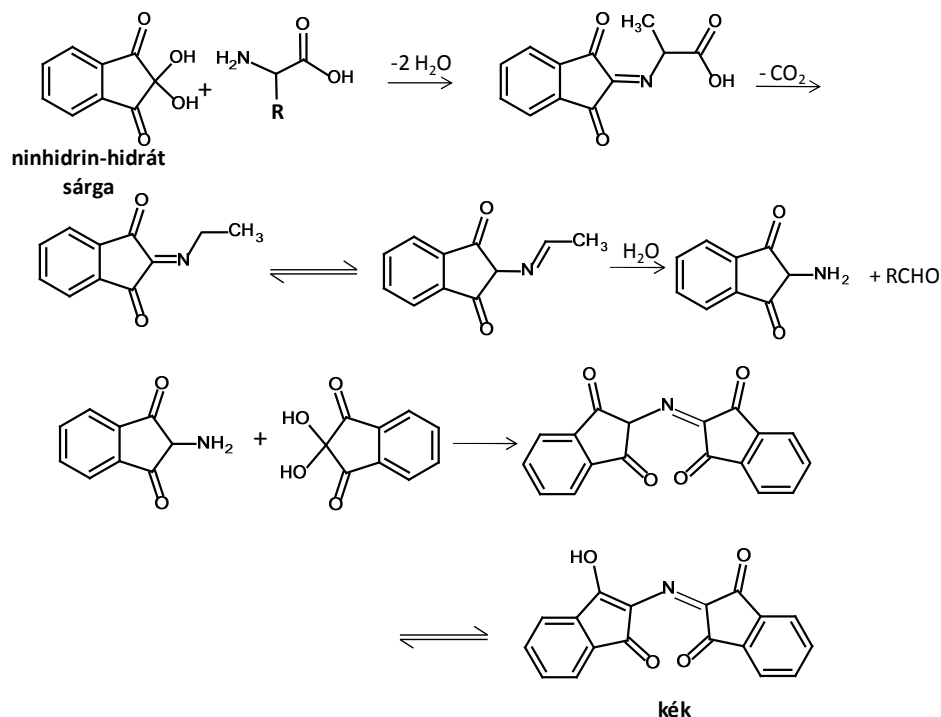
In situ aktívészterek kialakítására alkalmasak még a HOBt és a HOAt különböző ónium származékainak hexafluorofoszfát és tetrafluoroborát sói (BOP: benztriazol-1-il-oxi-trisz(dimetilamino)foszfónium-hexafluorofoszfát¹⁴³, PyBOP: benztriazol-1-il-oxi-trisz(pirrolidino)foszfónium-hexafluorofoszfát¹⁴⁴, HBTU: 2-(1H-benztriazol-1-il)1,1,3,3-tetrametilurónium-hexafluorofoszfát¹⁴⁵, TBTU: benztriazol-1-il-1,1,3,3-tetrametil-urónium-tetrafluoroborát¹⁴⁶, 13. ábra), melyek tercier bázisok (DIEA, NMM) jelenlétében a leghatékonyabbak.



13. ábra: a: BOP, b: PyBOP, c: HBTU, d: TBTU

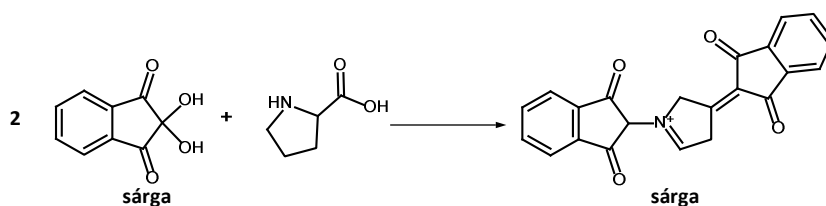
4.2.3 A kapcsolás végbemenetelének ellenőrzése

A kapcsolások sikerességének ellenőrzésére az ún. Kaiser-teszt (ninhidrin-teszt) alkalmazható, mely a szabad aminosocsoporttal rendelkező peptidszármazékok kimutatására alkalmas^{147,148} (14. ábra).



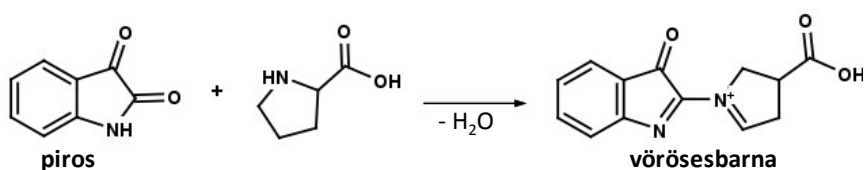
14. ábra: Kaiser-teszt

Ez azonban csak primer aminokat tartalmazó α -aminosavak esetén történik így, ezért prolin (iminosav) esetén nem használható, mivel a reakció színváltozás nélkül lejátsszódik le (15. ábra).



15. ábra: A ninhidrin reakciója prolinnal

Ebben az esetben ninhidrin helyet izatint szükséges alkalmazni, amely a prolinnal sikertelen kapcsolási reakció esetén reagálva vörösesbarna színreakciót ad (16. ábra).¹⁴⁹



16. ábra: Az izatin reakciója prolinnal

A Kaiser-teszt rendkívül érzékeny, akár már 1% szabad aminosocsoport jelenlétében is

erősen elszíneződik (a gyanta szemcsék és/vagy az oldat kék színű lesz).

4.2.4 A peptidek hasítása a gyantáról

Fmoc/^tBu stratégia esetén trifluorecetsavval hasítjuk le a gyantáról a peptidet. A peptid-gyanta kötés hasításával egy időben a savra érzékeny oldallánc védőcsoportok is eltávolíthatók. A keletkező reaktív karbokationok befogására a szekvenciában található aminosavak és védőcsoportok típusától függő „gyökfogókat” alkalmazunk. Az ilyen, enyhén savas körülmények között a peptid hidrolízise víz jelenlétében nem történhet meg, ezért a *terc*-butil kation semlegesítésére alkalmazható víz „gyökfogóként”, ami *terc*-butanol képződés közben semlegesíti a reaktív karbokationt. További „gyökfogók”: az anizol, a fenol, krezolok, különféle tio-vegyületek (tioanizol, tiofenol, tiokrezolok, 1,2-etánditiol (EDT)), a trietilszilán (TES) és a triizopropilszilán (TIS). Az oxidáció visszaszorítására a hasítóelegyben merkaptó-acetamidot, EDT-t, ditiotreitol (DTT), tioanizolt használhatunk.^{150,151}

4.2.5 Ciklopeptidek előállítása

Doktori munkám során előállítottam olyan szomatosztatin analógokat, amelyek ciklopeptidek. Ezekben az esetekben a ciklus egy diszulfid-híd kialakításával jött létre. Más ciklikus peptidekben a ciklust alkothatja csak amid-kötés (laktám), ekkor homodetikus ciklopeptidről beszélünk, vagy heterodetikus ciklopeptid, mint a már említett diszulfid-híd, vagy észter- (lakton), éter-, tioéter-, oxim-, hidrazon- továbbá tiazolidin-kötés.

A kapcsolódási pont elhelyezkedésétől függően az alábbi ciklopeptideket különböztetjük meg:

- head-to-tail (fej-farok)
- side chain-to-tail (oldallánc-farok)
- side chain-to-head (oldallánc-fej)
- side chain-to-side chain (oldallánc-oldallánc)
- branched (elágazó)

A csak amid-kötést tartalmazó ciklikus peptid esetén szelektíven eltávolítható, ortogonális védelemre van szükség a ciklusban résztvevő amino- és karboxilcsoportoknál. Diszulfid-híd kialakításához csak akkor van szükség ortogonális védelemre, ha több diszulfid-híd szeretnénk létrehozni. Más típusú ciklizálásnál nincs szükség a ciklusban résztvevő funkciós csoportok szelektív védelmére, mert ezeket általában kemoszелеktív ligációs módszerrel állítják elő.

A ciklus kialakítása történhet oldatfázisban vagy a gyantán. Az első esetben a ciklizálási

reakciót híg oldatban ($< 0,2$ mg/ml) végezzük. Gyantán történő ciklizálás esetén pedig pszeudo-hígítást, nagyon alacsony kapacitású ($0,2$ - $0,3$ mmol/g) gyantát alkalmazunk, az intermolekuláris reakciók (ciklodimerizáció, oligomerizáció, polimerizáció) elkerülése végett.

4.3 A peptidek tisztítására és jellemzésére alkalmazott módszerek

4.3.1 A nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia

Manapság a peptidkémia egyik leginkább alkalmazott analitikai és preparatív elválasztási módszere a normál és a fordított fázisú nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia. A két típus megkülönböztetése az álló és az áramló fázis polaritásviszonyaira vonatkozik. A normál fázisú rendszerekben poláris állófázist alkalmazunk, az elválasztandó komponens retenciója polaritásának növekedésével nő. Míg a fordított fázisú rendszer esetén, ahol apoláris állófázissal szemben áramoltatunk viszonylag poláris áramló fázist, a komponens polaritásának növekedésével annak retenciója csökken. A normál fázisú kromatográfiát jellemzően hidrofób, apoláris, vagy kevésbé poláris csoportokat tartalmazó vegyületeket tartalmazó minták elválasztására, a fordított fázisú (RP) folyadékkromatográfiát pedig poláris funkciós csoportot tartalmazó minta komponensek szeparálására használjuk.

A nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (HPLC) esetén kényszeráramlás segítségével (nagy nyomású pumparendszer: 5 - 40 MPa) adagoljuk az áramló fázist, az eluenseket. Az elválasztást alapvetően két elúciós módszerrel hajthatjuk végre. Amennyiben az áramló fázis összetétele az elválasztás ideje alatt nem változik, izokratikus elúcióról beszélünk, ha azonban az áramló fázis összetételét a komponensek szeparációja alatt változtatjuk, akkor gradiens elúciót valósítunk meg. A HPLC-s módszereket az oszlop méretétől függően alkalmazhatjuk mind analitikai vizsgálatokra, mind pedig félpreparatív illetve preparatív tisztításra.¹⁵²

Munkám során a vegyületek tisztítására többnyire RP-HPLC módszert alkalmaztam. Azonban a kurkumin származék előállítása során a reakció követésére a planáris folyadékkromatográfiák csoportjába tartozó klasszikus vékonyréteg kromatográfia módszerét is segítségül hívtam, továbbá az érzékeny hidrazon-kötést tartalmazó Dau=N-NH-CO-(CH₂)₂-CO-TT-232 konjugátum tisztítása esetén oszlop kromatográfiát alkalmaztam, melyeknél a folyadék kényszeráramlását a kapilláris erőhatások, illetve a gravitáció biztosítják.

4.3.2 Tömegspektrometria (mass spectrometry, MS)

Napjainkban a legáltalánosabban használt analitikai eljárás a nagyműszeres technikák

közé tartozó tömegspektrometria, amely alkalmas szerves és szervetlen komponensekből képződött ionok tömeg/töltés (m/z) arányának nagyhatékonyságú meghatározására. A módszer alapja az, hogy a vizsgálandó vegyületek részecskéiből gáz halmazállapotú ionokat állít elő a készülék, majd ezeket a relatív tömegük és töltésük hányadosa szerint szétválasztja és detektálja.^{153,154, 155}

Az általam előállított vegyületeket elektropray ionizációs tömegspektrométeren (ESI-MS), Bruker Daltonics Esquire 3000 Plus típusú készülékkel vizsgáltam. Az elektroporlasztásos ionizációs technika napjaink egyik legáltalánosabban használt lágyionizációs technikája, amely elektromos áram segítségével juttatja az ionokat oldatfázisból gázfázisba egy nagyfeszültségű rozsdamentes acél vagy kvarc szilika kapillárison keresztül az analizátorba. Így, az oldatban lévő ionos részecskéket a készülék megnövekedett érzékenységgel tudja analizálni.¹⁵⁶

A tömegspektrometriát két célból alkalmaztam. Egyrészt az előállított molekulák azonosítására, másrészt a különböző enzimekkel történő vizsgálatok során a képződő metabolitok beazonosítására.

Az enzimes vizsgálatok esetén a méréseket csatolt technikával (LC-MS) Dr. Marilena Manea irányításával a konstanzi egyetemen végeztem.

Az LC-MS egy olyan analitikai kémiai csatolt technika, amely egyesíti a folyadékkromatográfiát (jellemzően HPLC) fizikai elválasztó képességét a tömegspektrométer tömeganalizátori funkciójával. A HPLC a vegyületeket a konvencionális kromatográfia módszerével egy oszlopon szétválasztja, általában fordított fázisú módszert alkalmazva. Az így elválasztott komponensek jutnak be a tömegspektrométerbe, ahol a kromatográfia során felhasznált oldószerek elpárolognak, és a vegyületek ionizálódnak, szeparálódnak, majd detektálódnak. A nagy teljesítményű technika segítségével komplex biológiai minták különböző polaritású kis és nagy molekulái egyaránt elemezhetőek.

5 Eredmények és következtetések

Doktori munkám során irányított tumorterápiában alkalmazható gonadotropin-releasing hormon és szomatosztatin alapú konjugátumok tervezését, továbbfejlesztését, szintézisét, kémiai és biológiai jellemzését valósítottam meg. Tanulmányoztam a különböző irányító molekulaként választott peptidhormon származékok, a molekulákban történő szerkezeti változtatások szerepét elsősorban a konjugátumok *in vitro* citosztatikus hatására, továbbá a vegyületek térszerkezetére, sejtbejutási, penetrációs és receptorkötődési képességére, valamint oldhatósági tulajdonságára, és *in vivo* tumorelles hatásra. Egyes konjugátumok esetén meghatároztam azok lehetséges hatóanyagtartalmú metabolitjait.

5.1 Négyes helyzetben zsírsav láncokkal módosított daunorubicin-GnRH-III biokonjugátumok szintézise, *in vitro* és *in vivo* biológiai vizsgálata, szerkezet-hatás összefüggés vizsgálata

A 2.3.1.3 fejezet alapján a GnRH peptidhormon 4-es helyzetű szerin aminosava sem az endokrin aktivitásban, sem a tumorelles hatás kifejtésében, sem a receptor kötődésben nem játszik szerepet, mégis ez az aminosav, amelyet a legkevésbé módosítottak a különböző analógok kialakításakor. A GnRH peptidekben és származékaikban a ⁴Ser körüli kötések az emésztő enzimek (pl. α -kimotripszin, szubtilizin, angiotenzin konvertáló enzim (ACE)) fő hasítási helye.³⁷ A vegyületek stabilitása növelhető a ⁴Ser – N-Me-⁴Ser illetve ⁴Ser – Lys(Ac) cserével.^{63,64}, míg a változtatás az antiproliferatív hatást nem befolyásolja. A vegyületek emésztő enzimekkel (tripszin, kimotripszin, pepszin) szembeni stabilitása különösen akkor jelentős, ha szájon át történik a gyógyszer adagolása.

A GnRH-III szekvenciájában csak néhány módosítás megengedett a tumorelles hatás, illetve a receptor kötődés elvesztése nélkül (2.3.1.3 fejezet). Korábbi kutatási eredmények azt mutatják, hogy a GnRH-I molekulához hasonlóan a GnRH-III peptidben a 4-es pozícióban lévő szerin – N-Me-szerin, szerin – lizin, illetve szerin – oldalláncában acetilezett lizin csere növelte, vagy nem befolyásolta az eredeti molekula tumorsejt proliferációra gyakorolt hatását^{57,63,64} és kimotripszinnel szembeni stabilitását.⁶⁴ A 8-as pozícióban a lizin oldalláncának módosítása a receptor kötődést nem befolyásolja, viszont a hormonális hatást csökkentti.

Kutatási eredmények alapján a rövid szénláncú zsírsavak fontos építőkövei lehetnek az irányított tumorterápiában alkalmazott hatóanyag szállító rendszereknek (ld. 2.5.2.).¹⁵⁷

Az irodalmi előzményeket figyelembe véve olyan GnRH-III-daunorubicin konjugátumok előállítását terveztem, amelyekben a GnRH-III 4-es pozíciójában szerin helyett különböző lánchosszúságú zsírsavakkal acilezett lizin szerepel (Glp-His-Trp-Lys(X)-His-Asp-Trp-Lys(Dau=Aoa)-Pro-Gly-NH₂; ahol X = propionil (Pr), butiril (nBu), izobutiril (iBu), krotonil (CA), hexanoil (Hex), izovaleril (iVA), mirisztoil (Myr)). A rövidszénláncú telített zsírsavak mellé egy telítetlen zsírsav, a krotonsav és a hosszú szénláncú mirisztinsav is kiválasztásra került. Ezen zsírsavak kiválasztását az indokolta, hogy a krotonil-koenzim A a vajsav fermentáció intermedier molekulája, a mirisztinsav pedig a humán szérum albuminhoz képes kötődni, így hozzásegítheti a mirisztoil származékok szignifikáns felhalmozódását a tumorok környezetében.¹⁵⁸ A módosításokkal növelni kívántam a konjugátumok sejtbefutási képességét és tumorelles hatását, valamint a vegyületek enzimekkel szembeni stabilitását. A hatóanyagot oxim-kötéssel kapcsoltam az irányító molekula 8-as helyzetű lizinjéhez, ahogy az a kutatócsoportban, a korábban előállított variánsok esetében is történt.

Az *in vitro* sejtbefutási és citosztatikus hatás vizsgálatok mellett tanulmányoztam a konjugátumok másodlagos szerkezetét, lipofilitását, penetrációs képességét. Továbbá megvizsgáltam a vegyületek stabilitását sejtenyésző médiumban és kimotripszin emésztő enzim jelenlétében az esetleges orális adagolás lehetőségének szempontjából, valamint lebomlásukat lizoszóma preparátumban a keletkező metabolitok feltérképezése érdekében. A kutatócsoportban korábban előállított és vizsgált GnRH-III(⁴Lys(Ac), ⁸Lys(Dau=Aoa)) stabil volt tripszin és pepszin jelenlétében, ezért ez alapján feltételeztem, hogy az új konjugátumok sem bomlanak az említett enzimek hatására.⁶⁴ A vizsgálatok alapján legjobb hatásúnak bizonyuló konjugátum GnRH receptor kötődését és *in vivo* tumorelles hatását is megvizsgáltuk.

5.1.1 GnRH-III(⁴Lys(X), ⁸Lys(Dau=Aoa)) konjugátumok előállítása

A konjugátumok előállítása két fő lépésben történt. Első lépésben elkészítettem a 4-es pozícióban zsírsavláncokkal, 8-as pozícióban aminooxiacetyl-csoporttal módosított [⁴Lys]GnRH-III származékokat, majd második lépésben oxim-kötéssel kialakítottam a konjugátumokat.

Azért esett a választásom az oxim-kötés kialakítására, mert az aminooxi funkció és a karbonilcsoport nagy kemoselektivitással reagálnak.^{124,159} Azonban az oxim ligációhoz szükséges aminooxiacetylezett peptidek szintézisének, tisztításának és felhasználásának számos mellékreakció léphet fel. Ilyen mellékreakció lehet például az NH-O funkció *N*-túlacileződése a Boc-aminooxiacetyl-sav beépítése, vagy a peptidlánc továbbépítése során. Ez a mellékreakció

többféleképpen küszöbölhető ki, (1) a karbodiimid származékkal végzett acilezési reakció során nem használunk bázist, (2) a Boc-védett aminooxiecetsavból képzett aktív észterrel (pl.: Boc-Aoa-OSu, Boc-Aoa-OPcp: lásd: 5.6 fejezet) végezzük az acilezést, (3) a Boc-Aoa-OH-t nagy feleslegben rövid reakcióidővel kapcsoljuk. Egy másik mellékreakció, amellyel munkám során gyakorta találkoztam, az az aminooxi-csoport aldehidekkel és ketonokkal szembeni rendkívüli reaktivitása. Az aminooxiacetilezett peptidek a mosogatás után az edényben maradt nyomnyi acetonnal, vagy a műanyag eszközökben lágyítóként alkalmazott formaldehiddel is képesek elreagálni. Ez a mellékreakció mind a peptiddel végzett reakciók során (hasítás, ligáció), mind pedig a tisztítás során felléphet, sőt még a liofilizált tiszta peptid is elreagálhat. A probléma megoldásaként kutatócsoportunkban az aminooxiacetilezett peptidek hasítása során szabad aminooxiecetsavat adunk feleslegben a reakcióelegyhez karbonil befogó ágensként.¹⁶⁰ Tapasztalataink alapján ilyen körülmények között, peptid szekvenciától függően, nem játszódnak le jelentős mértékben mellékreakciók, és a hasított peptid akár hónapokig eltartható +4°C-on is. Így elkerülhetjük a különleges „aceton mentes” laboratóriumi körülmények bevezetését (argon, nitrogén atmoszféra; frissen desztillált dietil-éter a peptid hasítás utáni kicsapásához, friss eluensek a HPLC-s tisztításhoz, a peptidek tárolása -20°C-on).

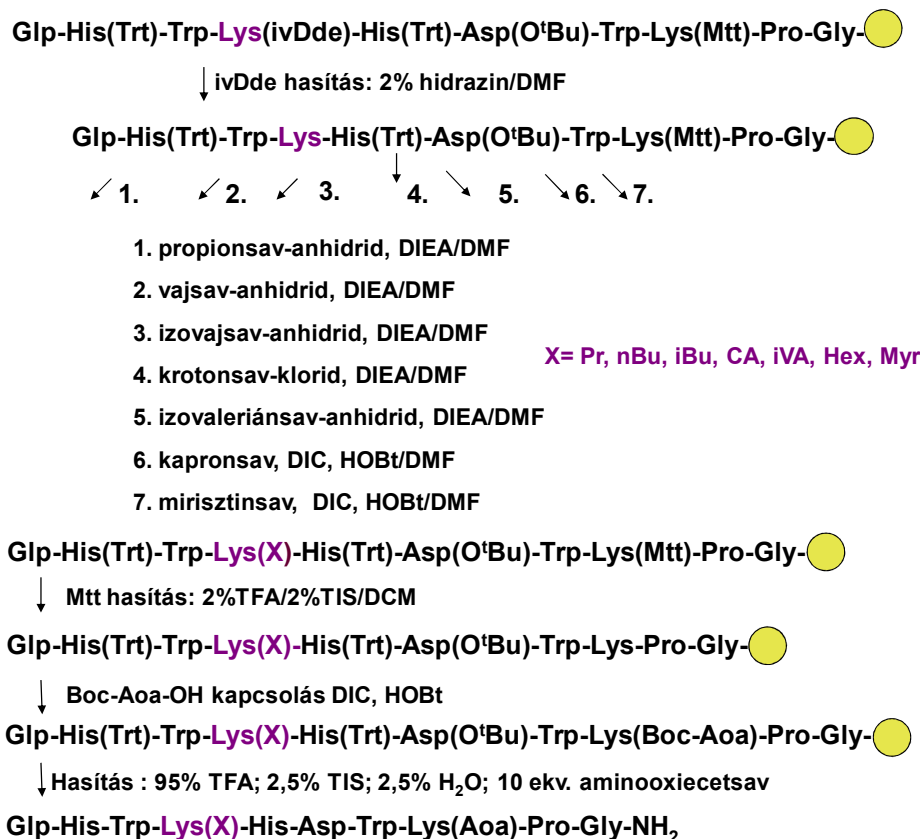
5.1.1.1 GnRH-III(⁴Lys(X), ⁸Lys(Aoa)) peptidek szintézise (X=Pr, iBu, nBu, CA, iVA, Hex, Myr)

A GnRH-III zsírsav analógok szintézisét manuálisan szilárdfázisú peptidszintézis módszerével valósítottam meg (17. ábra). A peptideket Rink-Amid MBHA gyantán építettem fel Fmoc/^tBu stratégia alkalmazásával. A szekvenciában található két lizin oldallánc védelmére ortogonális védőcsoport kombinációt alkalmaztam a szelektív védőcsoport eltávolítás érdekében. (Ortogonális védelemről beszélünk, ha két védőcsoportot különböző mechanizmus szerint tudunk lehasítani, pl. sav - bázis, sav - hidrogénezés, bázis - tiol.) A négyes helyzetben található lizin esetében Fmoc-Lys(ivDde)-OH, míg a 8-as pozícióba Fmoc-Lys(Mtt)-OH származékot építettem be. Az ivDde-csoport eltávolításához 2% hidrazin-hidrát dimetil-formamidos oldatát használtam. Az ivDde védőcsoport hasítása és a szabaddá vált ε-aminocsoport acilezése a különböző lánchosszúságú zsírsavakkal (X= propionil, izobutiril, butiril, krotonil, izovaleril, hexanoil, mirisztoil) az Mtt-csoport 2% trifluorecetsavas eltávolítása előtt történt. A krotonsav esetén az acilezéshez felhasznált reagens izomer elegy volt. A 2%-os trifluorecetsavas oldatban a peptid-gyanta kötés kellően stabil, így az Mtt-csoport a peptid gyantáról történő hasítása nélkül megvalósítható. Utolsó lépésként a Boc-

Aoa-OH kapcsolása következett DIC/HOBt kapcsolóreagensek mellett.

A különböző zsírsavakkal és aminosavakkal módosított GnRH-III peptideket minden esetben trifluorecetsavval hasítottam le a gyantáról megfelelő „gyökfogók” jelenlétében (lásd 6.3.1.1 fejezet).¹⁶⁰

A GnRH-III(⁴Lys(X), ⁸Lys(Aoa)) peptidek szintézisének részletes leírása a Kísérleti rész 6.3.1.1 fejezetében található, valamint a szintézis lépéseit 17. ábrán foglaltam össze.



17. ábra: A GnRH-III(⁴Lys(X), ⁸Lys(Aoa)) peptidek szintézisének menete

A kapott nyers peptideket félpreparatív RP-HPLC rendszerrel tisztítottam, tisztaságukat analitikai RP-HPLC-vel ellenőriztem és azonosításukra ESI-MS-t alkalmaztam. Az analíziseket analitikai RP-HPLC segítségével gyűjtött kis mennyiségű liofilizált mintákból végeztem el (3. táblázat, Függelék: **F1.- F7. ábra**), ugyanis a peptideket érzékenyséjük miatt a tisztítást követően izolálás nélkül az oldószer bepárlása után használtam fel a konjugálási reakciókban, ezért pontos hozamot nem állt módomban számolni. Egyébiránt a peptidek és konjugátumok előállításának termelését a tömegadatokból nem lehetséges pontosan kiszámolni, mivel a liofilizált termékek vizet és trifluorecetsavat kötnek meg, amely meghamisítja a mért tömegértékeket. Továbbá a szintézisek során a kapcsolások sikerességét ellenőrizendő tesztek során csökken a kiindulási gyanta mennyisége, így az eredeti, a gyantakapacitás figyelembevételével számolt termelés sem adna releváns értéket.

3. táblázat: A GnRH-III(⁴Lys(X), ⁸Lys(Aoa)) peptidek analitikai jellemzése

Vegyület	^a RP-HPLC R _t [perc]	^b ESI-MS MW _{számolt} / MW _{mért}
GnRH-III(⁴ Lys(Pr), ⁸ Lys(Aoa))	22,6	1430,0 / 1430,1
GnRH-III(⁴ Lys(iBu), ⁸ Lys(Aoa))	23,5	1443,7 / 1443,5
GnRH-III(⁴ Lys(nBu), ⁸ Lys(Aoa))	23,5	1443,7 / 1443,2
GnRH-III(⁴ Lys(CA), ⁸ Lys(Aoa))	23,9	1441,1 / 1441,0
GnRH-III(⁴ Lys(iVA), ⁸ Lys(Aoa))	24,2	1457,1 / 1456,9
GnRH-III(⁴ Lys(Hex), ⁸ Lys(Aoa))	25,7	1472,6 / 1472,0
GnRH-III(⁴ Lys(My), ⁸ Lys(Aoa))	35,7	1583,6 / 1584,1

^aKnauer HPLC rendszer, oszlop: Phenomenex Luna, C18, 5µm, 100Å; 250x4,6 mm; áramlási sebesség: 1 ml/perc, gradiens: 0-5 perc: 0% B; 50perc: 90% B; Eluensek: A: 0,1% TFA/víz; B: 0,1% TFA/80% acetonitril-20% víz, detektálás: λ=220 nm.

^bBruker Daltonics Esquire 3000+ ioncsapdás tömegspektrométer (Bremen, Germany) (spektrumok felvétele 50–2000 m/z tartományban)

5.1.1.2 Daunorubicin tumorellenes hatóanyag konjugálása a zsírsavakkal

módosított GnRH-III analógokhoz

A peptidek aminooxiacetil részlete és a hatóanyag 13-as C atomján lévő oxocsoportja között széles pH tartományban (pH=3-8) stabil oxim-kötést¹²⁴ alakítottam ki. Enyhe savas körülmények között 0,2M ammónium-acetát pufferben (pH=5,0) konjugáltam a GnRH-III származékokhoz a tumorellenes hatóanyagot szobahőmérsékleten 16 órás reakcióidővel. A konjugátumokat félpreparatív RP-HPLC-vel tisztítottam, majd analitikai RP-HPLC-vel és tömegspektrométerrel analizáltam. (A dolgozat során számjelzéssel csak a végtermék konjugátumokat láttam el.) A daunorubicint tartalmazó vegyületek ESI-MS mérése során a daunorubicinban található glikozidos kötés fragmentációja tapasztalható, ami a daunosamin részlet hiánya (-129, -147 Da) okozza a mért tömegekben (4. táblázat, Függelék: **F8.- F14. ábra**).

4. táblázat: A GnRH-III(⁴Lys(X), ⁸Lys(Dau=Aoa)) biokonjugátumok analitikai jellemzése

Vegyület	^a RP-HPLC R _t [perc]	^b ESI-MS MW _{számolt} / MW _{mért}
GnRH-III(⁴ Lys(Pr), ⁸ Lys(Dau=Aoa)) (1)	26,4	1939,1 / 1938,7
GnRH-III(⁴ Lys(iBu), ⁸ Lys(Dau=Aoa)) (2)	27,8	1953,1 / 1952,7
GnRH-III(⁴ Lys(nBu), ⁸ Lys(Dau=Aoa)) (3)	27,8	1953,1 / 1952,7
GnRH-III(⁴ Lys(CA), ⁸ Lys(Dau=Aoa)) (4)	27,7	1951,1 / 1950,4
GnRH-III(⁴ Lys(iVA), ⁸ Lys(Dau=Aoa)) (5)	28,2	1967,1 / 1966,4
GnRH-III(⁴ Lys(Hex), ⁸ Lys(Dau=Aoa)) (6)	30,7	1981,1 / 1980,6
GnRH-III(⁴ Lys(My), ⁸ Lys(Dau=Aoa)) (7)	37,1	2093,3 / 2092,8

^aKnauer HPLC rendszer, oszlop: Phenomenex Luna, C18, 5µm, 100Å; 250x4,6 mm; áramlási sebesség: 1 ml/perc, gradiens: 0-5 perc: 0% B; 50perc: 90% B; Eluensek: A: 0,1% TFA/víz; B: 0,1% TFA/80% acetonitril-20% víz, detektálás: λ=220 nm.

^bBruker Daltonics Esquire 3000+ ioncsapdás tömegspektrométer (Bremen, Germany) (spektrumok felvétele 50–2000 m/z tartományban)

Ezen fragmenseket a tömegspektrumokban csillaggal jelöltem (ez vonatkozik az összes daunorubicin tartalmú konjugátumra a későbbiek során is). Bár a krotonsav esetén az alkalmazott krotonsav-klorid izomerek keveréke volt, sem a peptid, sem pedig a konjugátum esetén nem tapasztaltam az izomerek szétválását a vegyületek tisztítása és analízise során. Termelés számítására úgyszintén nem volt módom. Viszont a folyadékkromatográfiás vizsgálat alapján megállapítottam, hogy az oxim-kötés kialakítása közel kvantitatíven lejátszódott, a termékeket csak a feleslegben alkalmazott daunorubicintől kellett elválasztanom. Ez vonatkozik a későbbiekben a többi oxim-kötésű konjugátumra is.

5.1.2 A GnRH-III(⁴Lys(X), ⁸Lys(Dau=Aoa)) konjugátumok enzimatiszta stabilitása/degradációja kimotripszin és lizoszómális enzimekkel szemben

A gyógyszerjelölt molekulák kutatása és fejlesztése során stabilitásuk, metabolitjaik felderítése rendkívül fontos. Ebben segítségünkre lehetnek olyan *in vitro* módszerek, melyek a vegyületek stabilitását, vagy lebomlását gasztrointesztinális vagy lizoszómális enzimek jelenlétében vizsgálják. Ezek segítségével akár a vegyületek *in vivo* stabilitására, metabolizmusára is következtethetünk.¹⁶¹

Az irányított tumorterápia célja, hogy a tumorelleses szert célzottan, specifikusan a tumorsejtbe szállítsa, így előzve meg a nem kívánt mellékhatásokat. Ehhez egyrészt a konjugátumokban lévő két egység (hatóanyag molekula, célbajuttató vegyület) közti kötés típusát kell úgy megválasztanunk, hogy az a keringési és gasztrointesztinális rendszerben stabil legyen, elkerülve a korai hatóanyag felszabadulás okozta mellékhatásokat. Tehát a két egységnek ellenállónak kell lennie a gyomor és a bélrendszer emésztő enzimeivel szemben is, főként, ha szájon át kívánjuk adagolni a gyógyszert. Ugyanakkor a tumorsejten belül szükséges a hatóanyag aktív formában történő felszabadulása.¹⁶²

A GnRH-III(⁴Lys(X), ⁸Lys(Dau=Aoa)) konjugátumokban a daunorubicin és a peptid között oxim-kötést alakítottam ki, mely pH=3-8 tartományban kémiailag, továbbá *in vitro* és *in vivo* körülmények között is stabil.¹⁶³ A kutatócsoportban korábban kifejlesztett és vizsgált GnRH-III(⁴Lys(Ac), ⁸Lys(Dau=Aoa)) konjugátum humán szérumban, pepszin és tripszin jelenlétében is stabil volt 24 órán keresztül. Az α -kimotripszin esetén a ³Trp – ⁴Lys(Ac)-kötés elhasadt, bár lassabban, mint az eredeti GnRH-III szekenciát tartalmazó konjugátumban a ³Trp – ⁴Ser-kötés.^{164,165} Ezért ezen előzményekre alapozva a GnRH-III(⁴Lys(X), ⁸Lys(Dau=Aoa)) konjugátumok tripszinnel illetve pepszinnel történő vizsgálatait nem végeztem el, stabilitásukat és lebomlási profiljukat sejtenyészti médiumban, α -kimotripszin és patkány máj lizoszóma jelenlétében határoztam meg.

5.1.2.1 A GnRH-III(⁴Lys(X), ⁸Lys(Dau=Aoa)) stabilitása sejtenyésző médiumban

A vizsgálatok célja az volt, hogy igazoljam, a GnRH-III(⁴Lys(X), ⁸Lys(Dau=Aoa)) biokonjugátumok stabilitását az *in vitro* vizsgálatok körülményei között. Ezért analitikai RP-HPLC segítségével megvizsgáltam a konjugátumok stabilitását sejtenyésző médiumban, 37°C-on 6 órán keresztül. Ezen körülmények között mind a 7 biokonjugátum stabilnak bizonyult, a HPLC kromatogramokban (*Függelék: F15. ábra*) a médiumból származó összetevőkön kívül csak az intakt biokonjugátumokat azonosítottam.

5.1.2.2 A GnRH-III(⁴Lys(X), ⁸Lys(Dau=Aoa)) biokonjugátumok α -kimotripszin emésztő enzim jelenlétében

A konjugátumok *per os* (orális) adagolhatóságát a proteolitikus enzimekkel szemben mutatott stabilitásuk határozza meg. A GnRH és származékai a ³Trp – ⁴Ser kötés helyén a legérzékenyebb az α -kimotripszin enzim hatásával szemben. A korábbi eredmények alapján a (GnRH-III(*N*-Me-⁴Ser), ⁸Lys(Dau=Aoa)) esetében 24 óra alatt csak a biokonjugátum 37%-a bomlott el kimotripszin hatására. Ezzel szemben a (GnRH-III(⁴Lys(Ac), ⁸Lys(Dau=Aoa)) konjugátum már 6 óra elteltével 67%-ában, 24 óra után pedig a teljes mennyiség degradálódott. Az eredeti GnRH-III(⁴Ser, ⁸Lys(Dau=Aoa)) molekula már 6 óra inkubálási idő után szinte teljes mértékben elbomlott.⁶⁴

5. táblázat: A hasítás mértéke a zsírsavlánc függvényében

Zsírsavlánc	Intakt biokonjugátum	
	6 óra elteltével	24 óra elteltével
X=		
Pr	55%	0%
iBu	10%	0%
nBu	64%	0%
CA	50%	0%
iVA	66%	0%
Hex	70%	10%

Az **1-6** biokonjugátumok vizsgálata során a korábbi eredményeinkhez hasonlóan α -kimotripszin jelenlétében a ³Trp – ⁴Lys(X)-peptid kötés hasadását tudtuk kimutatni. Az enzim hatására létrejövő hasítások időbeni változását az *5. táblázatban* foglaltam össze, valamint a *Függelék F16. ábráján* szemléltetem, a tömegspektrumokat pedig a **17. ábrán** mutatom be. Az azonosított fragmenseket a *Függelék F1. táblázatában* összegeztem.

A GnRH-III(⁴Lys(My), ⁸Lys(Dau=Aoa)) (**7**) esetében a konjugátum oldékonysági problémái miatt csak nagyon alacsony intenzitású csúcsokat detektáltam a

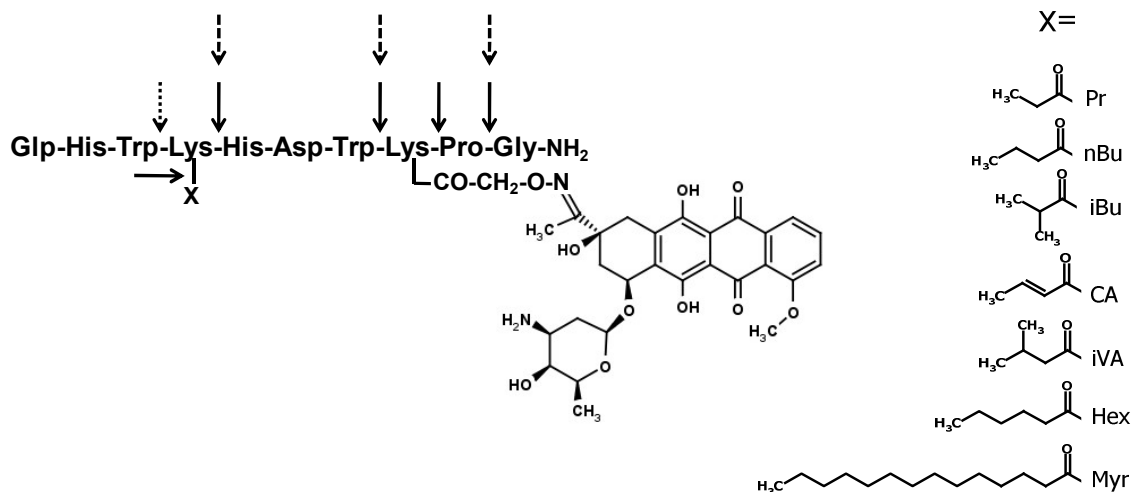
kromatogramokban, és a tömegspektrumokból is csak az intakt biokonjugátum volt azonosítható. A hasítás mértékét befolyásolta a vegyületben található zsírsavlánc minősége.

A zsírsavlánc hossza és a degradáció mértéke között korreláció fedezhető fel, kivéve a GnRH-III(⁴Lys(iBu), ⁸Lys(Dau=Aoa)) (2) konjugátumot, amely a többivel összehasonlítva kimotripszin hatására jóval hamarabb elbomlott. A 2-es biokonjugátum körülbelül 60%-a 4 óra elteltével elbomlott és a degradáció szinte teljesen végbement (90%-a hasadt) 6 óra alatt. Intakt konjugátum 24 óra elteltével már nem volt azonosítható. A reakcióból vett minták tömegspektrometriai analízise során ³Trp – ⁴Lys(iBu) hasítási helyet azonosítottam (H-K(iBu)HDWK(Dau=Aoa)PG-NH₂ fragmens: *m/z* 759,7 (2+) és 506,8 (3+)). A többi konjugátumot tekintve a leggyorsabban degradálódó biokonjugátum a GnRH-III(⁴Lys(Pr), ⁸Lys(Dau=Aoa)) volt. Hat óra elteltével a vegyület 45%-a bomlott el, 24 óra elteltével pedig nem tapasztaltam intakt biokonjugátumot. Tömegspektrométerrel a ³Trp – ⁴Lys(Pr) hasítási helyet állapítottam meg (H-K(Pr)HDWK(Dau=Aoa)PG-NH₂ fragmens: *m/z* 752,9 (2+) és 502,3 (3+)). A zsírsavlánc hosszának növekedésével a konjugátumok kimotripszines emésztéssel szembeni stabilitása is nőtt. A GnRH-III(⁴Lys(nBu), ⁸Lys(Dau=Aoa)) biokonjugátum csupán 36%-a hasadt el 6 óra alatt, habár 24 óra után a vegyület teljesen elbomlott. Ugyancsak a ³Trp – ⁴Lys(nBu) hasítási helyet azonosítottam (H-K(nBu)HDWK(Dau=Aoa)PG-NH₂ fragmens: *m/z* 759,9 (2+) és 506,9 (3+)). A telítetlen kronsavat tartalmazó 4-es számú biokonjugátum kevésbé mutatkozott stabilnak, mint a 3-as számú hasonlóan négy szénatomot tartalmazó, lineáris vajsavval módosított. A GnRH-III(⁴Lys(CA), ⁸Lys(Dau=Aoa)) 6 óra után 50%-ban, míg 24 óra elteltével teljesen elbomlott, tekintve, hogy egyedül a H-K(CA)HDWK(Dau=Aoa)PG-NH₂ fragmens volt detektálható (*m/z* 758,8 (2+) és 506,2 (3+)). Az 5-ös számú, öt szénatomos, izovaleriánsavval acilezett vegyület ellenállóbb volt kimotripszinnel szemben, mint a 1-4 konjugátumok, 6 óra után csak a 34%-a, 8 óra elteltével pedig csak 50%-ban bomlott. Azonban 24 óra elteltével ebben az esetben sem volt intakt vegyület kimutatható, csak a H-K(iVA)HDWK(Dau=Aoa)PG-NH₂ fragmens (*m/z* 767,0 (2+) és 511,6 (3+)). A leginkább stabil vizsgált biokonjugátum a 6-os számú volt. A GnRH-III(⁴Lys(Hex), ⁸Lys(Dau=Aoa)) hatóanyag-peptid konjugátum csupán 30%-a bomlott el 6 óra elteltével, és még 24 óra után is 10%-ban tudtam detektálni az intakt konjugátumot. A tömegspektrométerrel a H-K(Hex)HDWK(Dau=Aoa)PG-NH₂ fragmenst azonosítottam (*m/z* 774,1 (2+) és 516,4 (3+)). Ezen eredményeket a kutatócsoportban végzett korábbi stabilitás vizsgálatokkal összehasonlítva (pl: GnRH-III(⁴Lys(Ac), ⁸Lys(Dau=Aoa)) – 33% intakt biokonjugátum 6 óra után), arra a következtetésre jutottam, hogy a GnRH-III peptidben a 4-es helyzetben a lizin oldalláncának acilezése rövid szénláncú zsírsavakkal megnövelte a

konjugátumok kimotripszinnel szembeni stabilitását. Emiatt a GnRH-III(⁴Lys(X), ⁸Lys(Dau=Aoa)) vegyületek a szájon át történő gyógyszer adagolás lehetséges célvegyületei lehetnek. Kivételt ez alól az izovajsavat tartalmazó biokonjugátum jelenti, amely a legérzékenyebb volt az enzimmel szemben, csupán 10% intakt vegyületet detektáltam a reakció elegyből 6 óra elteltével. Mivel a hatóanyagok átlagosan maximum 2-4 óra alatt felszívódnak a béltraktusból, ezért a mérési eredmények közül a legrelevánsabb adatok a 6 óra elteltével tapasztaltak.

5.1.2.3 A GnRH-III(⁴Lys(X), ⁸Lys(Dau=Aoa)) biokonjugátumok patkány máj lizoszóma homogenátum jelenlétében végzett lebomlási vizsgálata LC-MS módszerrel

A patkány máj lizoszóma preparátummal végzett emésztési kísérleteket ugyancsak LC-MS módszerével vizsgáltam. Az emésztés során kapott fragmenseket (a kimotripszinnel végzett kísérletekben azonosítottakkal egyetemben) a 18. ábrán szemléltetem, valamint a Függelékben található F2. táblázatban mutatom be az eredményeket, amelyekből megállapítható, hogy mind a 7 biokonjugátumot az enzim elegy lebontotta különböző peptid fragmenseket és daunorubicin tartalmú metabolitokat eredményezve.



18. ábra: Hasítási helyek patkány máj lizoszóma homogenátum jelenlétében (folytonos vonal), kimotripszin jelenlétben (pöttyözött vonal), továbbá a GnRH-III(⁴Lys(My), ⁸Lys(Dau=Aoa)) lizoszómális proteolízise során képződött fragmensek (szaggatott vonal)

A 7-es, mirisztinsavat tartalmazó konjugátum vizsgálatakor nagyon kis mennyiségű metabolitot detektáltam, mivel a vegyület rosszul oldódott az alkalmazott nátrium-acetát pufferben. A kutatócsoportban korábban tapasztaltakkal megegyezően szabad hatóanyagot nem észleltem a tömegspektrometriás vizsgálatok során egyik konjugátum esetében sem. A

legkisebb hatóanyagot tartalmazó metabolit a H-Lys(Dau=Aoa)-OH volt (m/z 729,5 (1+)) detektálható minden esetben. Erről a fragmensről kutatócsoportunkban korábban bebizonyították, hogy képes a DNS-hez kötődni.¹²⁵ A Függelékben található **F18. ábrán** mutatom be a 2 és 24 óra után a lizoszóma homogenátummal inkubált **1-7** biokonjugátumok reakcióelegyeiből mért tömegspektrumokat.

Kis mennyiségben feltehetően a <EHWK-OH peptid fragmenshez tartozó 581,2 (1+) m/z -t is azonosítottam a tömegspektrumokból, ami arra enged következtetni, hogy a ⁴Lys és a zsírsav közötti amid-kötés elhasadt. Ez fontos lehet abból a szempontból, hogy a szabad zsírsav is kifejtheti apoptózist indukáló hatását.

5.1.3 A GnRH-III(⁴Lys(X), ⁸Lys(Dau=Aoa)) konjugátumok *in vitro* citosztatikus hatásának vizsgálata

A vegyületek *in vitro* citosztatikus hatását MCF-7 és HT-29 sejteken, valamint a két leghatékonyabb vegyület, az izobutiril-, és butirilcsoportot tartalmazó konjugátumok esetén HepG2 humán hepatóma és HL-60 humán promielocitás leukémia sejteken MTT-tesztel vizsgáltam 6 órás kezelést alkalmazva (43. ábra, 103. oldal) az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport Sejtlaborjában. A kezelést követően a sejteket további 72 órán át kultúrában tartottuk, majd meghatároztuk a konjugátumok sejtproliferációra gyakorolt hatását (6. táblázat).

6. táblázat: GnRH-III(⁴Lys(X), ⁸Lys(Dau=Aoa)) biokonjugátumok IC₅₀ értékének meghatározása MTT-teszt segítségével különböző tumorsejteken

Konjugátum	IC ₅₀ (μM)			
	MCF-7	HT-29	HL-60	HepG2
GnRH-III(⁴ Lys(Pr), ⁸ Lys(Dau=Aoa)) (1)	3,6 ± 0,7	17,2 ± 2,9	n.a.	n.a.
GnRH-III(⁴ Lys(iBu), ⁸ Lys(Dau=Aoa)) (2)	2,2 ± 0,0	2,0 ± 0,6	1,1 ± 0,4	2,8 ± 1,4
GnRH-III(⁴ Lys(nBu), ⁸ Lys(Dau=Aoa)) (3)	0,7 ± 0,2	2,2 ± 0,6	0,5 ± 0,1	1,0 ± 0,6
GnRH-III(⁴ Lys(CA), ⁸ Lys(Dau=Aoa)) (4)	1,6 ± 0,2	13,6 ± 4,2	n.a.	n.a.
GnRH-III(⁴ Lys(iVA), ⁸ Lys(Dau=Aoa)) (5)	2,5 ± 0,5	16,4 ± 4,5	n.a.	n.a.
GnRH-III(⁴ Lys(Hex), ⁸ Lys(Dau=Aoa)) (6)	1,5 ± 0,4	20,1 ± 4,2	n.a.	n.a.
GnRH-III(⁴ Lys(My), ⁸ Lys(Dau=Aoa)) (7)	6,8 ± 2,9	37,4 ± 1,0	n.a.	n.a.
GnRH-III(⁸ Lys(Dau=Aoa))	6,5 ± 1,8	27,8 ± 4,2	n.a.	n.a.
GnRH-III(⁴ Lys(Ac), ⁸ Lys(Dau=Aoa))	3,1 ± 1,7	7,4 ± 2,6	n.a.	n.a.
GnRH-III(⁴ Lys, ⁸ Lys(Dau=Aoa))	2,6 ± 0,8	8,1 ± 2,6	n.a.	n.a.
[D-Lys ⁶ (Dau=Aoa)]GnRH-I	4,1 ± 0,4	20,2 ± 5,0	n.a.	n.a.
Dau.HCl	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,05 ± 0,0	0,7 ± 0,2

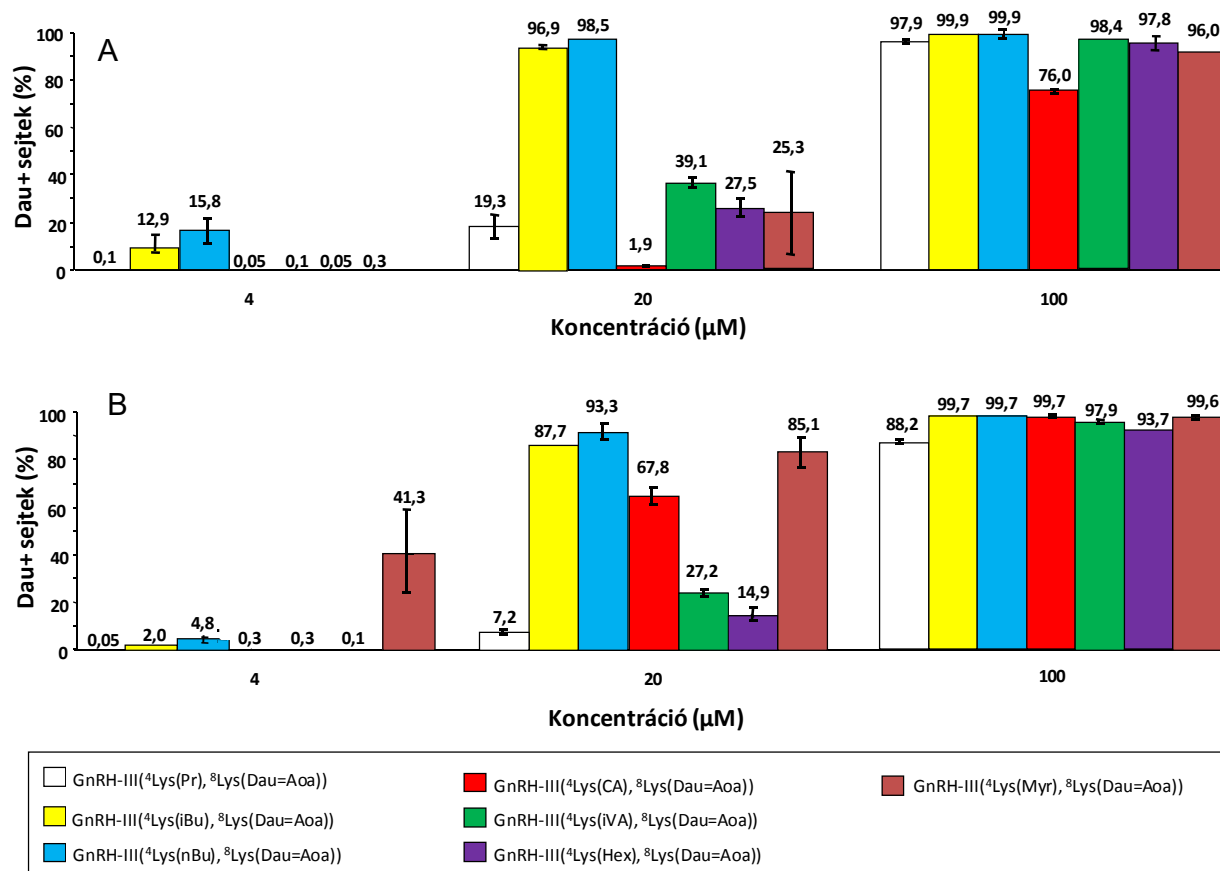
Hasonlóan a korábban leírt vizsgálatokhoz, a kapott eredményeket a kutatócsoportban

korábban készült vegyületekhez (GnRH-III(⁸Lys(Dau=Aoa))); GnRH-III(⁴Lys(X), ⁸Lys(Dau=Aoa)), X= Ø, Ac) hasonlítottam. A négyes helyzetű szerin – rövid szénláncú zsírsavakkal acilezett lizin csere az *in vitro* citosztatikus hatás növekedésével járt mind a HT-29, mind pedig az MCF-7 sejteken. A hatásnövekedés különösen HT-29 sejteken volt számottevő. A mirisztinsavval módosított konjugátum esetében nem tapasztaltam szignifikáns javulást az *in vitro* citosztatikus hatásban, ami magyarázható a vegyület rendkívül rossz oldhatóságával is. Az irodalmi adatokkal megegyezően^{165,52} a konjugátumok többsége MCF-7 sejteken jobb hatást mutatott, mint HT-29 sejteken. Ez a hatásbeli különbség a tumorsejteken található receptorok számában való különbséggel magyarázható. Ezzel szemben mind a HT-29, mind az MCF-7 sejteken mért IC₅₀ értékek hasonlóknak bizonyultak a vajsav izomereket tartalmazó konjugátumok esetén (**2**, **3**), mely eredményekre magyarázatként szolgálhat a vajsav és az izovajsav HT-29 sejtekben tapasztalt apoptotikus és antiproliferációs tulajdonsága.¹⁰⁹ Az MCF-7 sejteken mért eredményeket összehasonlítva megfigyelhető, hogy a vajsavat és izovajsavat tartalmazó biokonjugátumok csak kismértékben bizonyultak jobbnak, mint a többi zsírsavlánccal acilezett vegyület. Amennyiben a HT-29 sejteken mért eredményeket vetem össze, akkor a **2** és **3** vegyület esetén szignifikáns *in vitro* antiproliferatív hatásnövekedést tapasztaltam a többivel szemben. Ezeket az eredményeket a vajsav már említett vastagbél tumorsejtekre gyakorolt antitumor hatásával vagy más alternatív sejten belüli útvonalakkal, esetleg degradációs folyamatokkal indokolhatjuk. Az eredményekből következtetésként levonhatom, hogy a GnRH-III irányító molekula 4-es helyzetű Ser részletének cseréje rövid szénláncú zsírsavakkal acilezett lizinre a daunorubicin-GnRH-III biokonjugátumok *in vitro* citosztatikus hatásában jelentős javulást eredményezett, különös tekintettel a vajsav izomereket tartalmazókra.

5.1.4 A GnRH-III(⁴Lys(X), ⁸Lys(Dau=Aoa)) konjugátumok sejtbejutási képessége MCF-7 és HT-29 sejteken

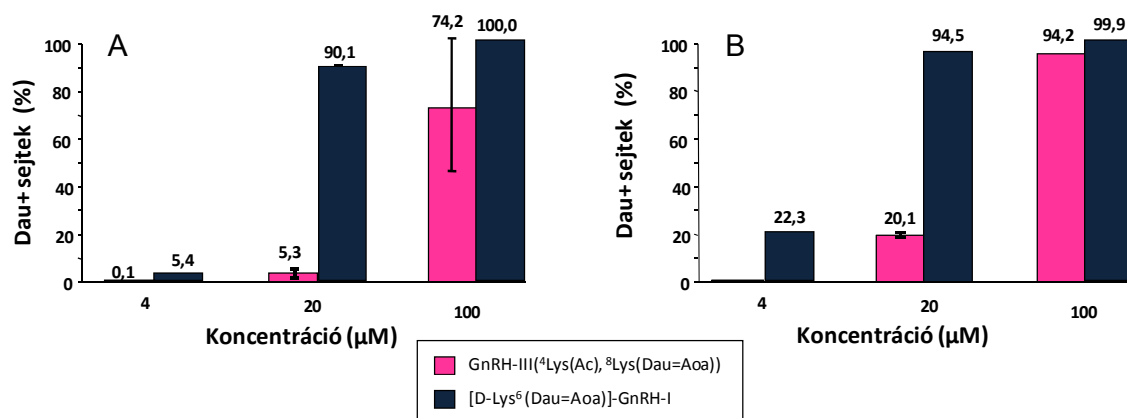
A biokonjugátumok sejtek általi felvételét áramlási citometria módszerével vizsgáltam HT-29 humán vastagbél adenokarcinóma, és MCF-7 humán emlő adenokarcinóma sejteken 0,16-100 µM koncentráció tartományban 6 órás inkubáció mellett az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport Sejtlaborjában (44. ábra, 114. oldal). Mind a hét biokonjugátum vizsgálatakor koncentrációfüggő felvételt tapasztaltunk a különböző sejteken (19.-20. ábra). Mindkét sejtípus esetében már alacsonyabb (4 µM) koncentrációban tapasztalható volt sejtfelvétel. A konjugátumok közül az izovajsavat és a vajsavat tartalmazó biokonjugátumok jutottak be leghatékonyabban a sejtekbe. A HT-29 sejtek 96,9%-a (**2**-es vegyület) és 98,5%-a

(3-as vegyület) bizonyult daunorubicin pozitívnak (Dau pozitív) 20 μ M-os koncentrációban, míg 100 μ M esetén ez 99,9% és 99,9% (19. ábra).



19. ábra: A GnRH-III(⁴Lys(X), ⁸Lys(Dau=Aoa)) biokonjugátumok sejtbefutási képessége HT-29 sejteken (A), illetve MCF-7 sejteken (B) vizsgálva

Az MCF-7 sejteken történt vizsgálatokban az élő sejtek 87,7%-a tartalmazta a konjugátumot (2-es vegyület) és 93,3% (3-as vegyület) volt 20 μ M-os koncentrációban, míg a 100 μ M-os konjugátum koncentráció esetén a mért értékek 99,7% and 99,7% voltak (19. ábra).



20. ábra: A [D-Lys⁶(Dau=Aoa)]GnRH-I és GnRH-III(⁴Lys(Ac), ⁸Lys(Dau=Aoa)) biokonjugátumok sejtbefutási képessége (A) HT-29, illetve (B) MCF-7 sejteken

Ezen sejtfelvételi adatok alátámasztják a **2** és **3** vegyület esetén HT-29 sejteken tapasztalt szignifikáns *in vitro* antiproliferatív hatásnövekedést.

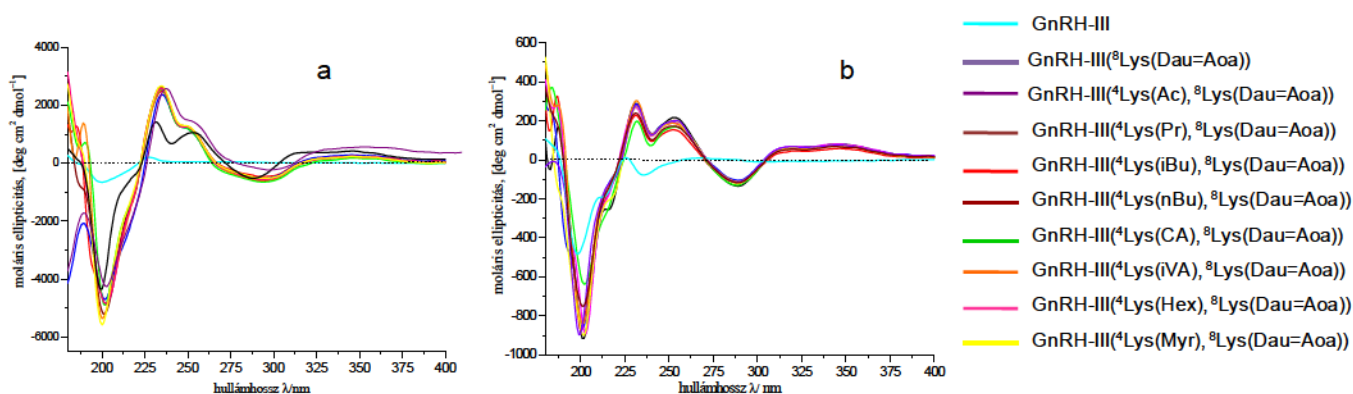
A mirisztinsavval acilezett biokonjugátum jutott be leghatékonyabban az MCF-7 sejtekbe az alacsony koncentráció tartományban (0,16-4 μ M). A Dau pozitív sejtek aránya 4 μ M koncentrációban mérve 41,3% volt, továbbá 20 μ M esetén a többi vegyülethez hasonlítva jelentős sejtfelvételt mérhettünk (Dau pozitív sejtek: 85,1%), amit tulajdoníthatunk esetleg a hosszabb zsírsavlánc okozta megváltozott receptor vagy membránkötődésnek. Mivel kíváncsi voltam arra, hogy a zsírsavakkal történt módosítások mennyire befolyásolták a molekula sejtbejutási képességét, ezért a kapott eredményeket a kutatócsoportban korábban előállított GnRH-III származékot és daunorubicint tartalmazó konjugátum (GnRH-III(⁴Lys(Ac), ⁸Lys(Dau=Aoa))), valamint a [*D*-Lys⁶(Dau=Aoa)]-GnRH-I) eredményeivel hasonlítottam össze.⁶⁴ A GnRH-III(⁴Lys(Ac), ⁸Lys(Dau=Aoa)) HT-29 sejteken vizsgálva az **1, 2, 3, 4, 6, 7** konjugátumoknál kevésbé hatékonyan jutott be, csak a sejtek 5,3%-a volt Dau pozitív 20 μ M-os koncentrációban és 74,2%-a 100 μ M-os koncentrációban. Az acetilezett konjugátum nagyobb mértékben jutott be MCF-7 sejtekbe, mint a propionsavval vagy a kapronsavval (hexánsavval) acilezett vegyületek, de számottevően alacsonyabb értéket mértünk, mint a többi konjugátumnál, mind 20 μ M (Dau pozitív sejtek: 20,1%), mind 100 μ M (Dau pozitív sejtek: 94,5%) koncentrációknál. Meg kell említenem ezen felül a dolgozat későbbi vizsgálatai szempontjából, hogy a szuperagonista humán GnRH-I származékot tartalmazó [*D*-Lys⁶(Dau=Aoa)]-GnRH-I (Glp-His-Trp-Ser-Tyr-*D*-Lys(Dau=Aoa)-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂) (2.3.1.1 fejezet) vegyület sejtbejutási képessége a vajsav izomereket tartalmazó származékok vizsgálatakor kapott eredményekhez hasonló.

A sejtfelvételi adatokban tapasztalt különbségekre magyarázatot szerettem volna adni, ezért a továbbiakban tanulmányoztam a biokonjugátumok másodlagos szerkezetét cirkuláris dikroizmus spektroszkópia segítségével, a lipofilitásukat víz-oktanol megoszlási hányadosuk meghatározásával, illetve penetrációs képességük vizsgálatával. Valamint megvizsgáltuk a leghatékonyabb **3**-as vegyület GnRH-I receptorhoz való affinitását is.

5.1.5 A GnRH-III(⁴Lys(X), ⁸Lys(Dau=Aoa)) konjugátumok másodlagos szerkezetének vizsgálata cirkuláris dikroizmus spektroszkópiával

Vizsgálni kívántam, hogy a 4-es pozícióban lévő lizin zsírsavakkal történő acilezése befolyásolja-e a biokonjugátumok másodlagos szerkezetét, amely változás esetleg hatást gyakorolhat a konjugátumok sejtbejutására. Ennek az eshetőségnek megvizsgálására a cirkuláris dikroizmus spektroszkópia módszerét¹⁶⁶ hívtam segítségül.

A CD spektroszkópai méréseket víz és trifluoretanol (TFE) oldószerekben végeztem Dr. Marilena Manea segítségével a konstanzi egyetemen. Az *in vitro* tesztek során alkalmazott körülményeket jobban modellezi a vizes közeg, a TFE pedig a sejtmembránt mimikálja, rendezettebb szerkezet kialakulását elősegítő tulajdonsága révén. Minden konjugátum vízben mért CD spectrumában $\lambda=200$ nm-nél egy erősen negatív sáv és $\lambda=230$ nm-nél egy pozitív sáv jelent meg, amiből arra következtettem, hogy a konjugátumok rendezetlen szerkezetűek (25. ábra). Az ugyancsak minden spektrumban megtalálható $\lambda=290$ nm körüli negatív sáv valószínűleg az aromás részeket kölcsönhatására utal (Trp és daunorubicin).¹⁶⁷ A trifluoretanolban felvett spektrumokat egy intenzív negatív sáv jellemzi $\lambda=200$ nm körül egy $\lambda=210$ nm-nél lévő vállal, valamint egy pozitív sáv $\lambda=230$ nm-nél és egy másik pozitív sáv $\lambda=250$ nm-nél, amiből ugyancsak a molekulák rendezetlen szerkezetére következtettem (21. ábra).



21. ábra: GnRH-III(⁴Lys(X), ⁸Lys(Dau=Aoa)) konjugátumok CD spektrumai vízben (a) és trifluoretanolban (b)

A spektrumban ugyancsak megjelenő negatív sáv $\lambda=290$ nm-nél valószínűleg az aromás részeket (Trp és daunorubicin) kölcsönhatásának eredménye. A 1-7 biokonjugátumok spektrumait összehasonlítottam a natív GnRH-III molekulával, valamint a kutatócsoportunkban korábban előállított két biokonjugátum (GnRH-III(⁸Lys(Dau=Aoa)) és GnRH-III(⁴Lys(Ac), ⁸Lys(Dau=Aoa)) spektrumával. Az adatokból arra következtettem, hogy a peptidek másodlagos szerkezetét nem befolyásolta a zsírsavlánc típusa, a vegyületek sejtbejutását valószínűsíthetően más folyamatok befolyásolhatják.

5.1.6 Biokonjugátumok lipofilitásának vizsgálata

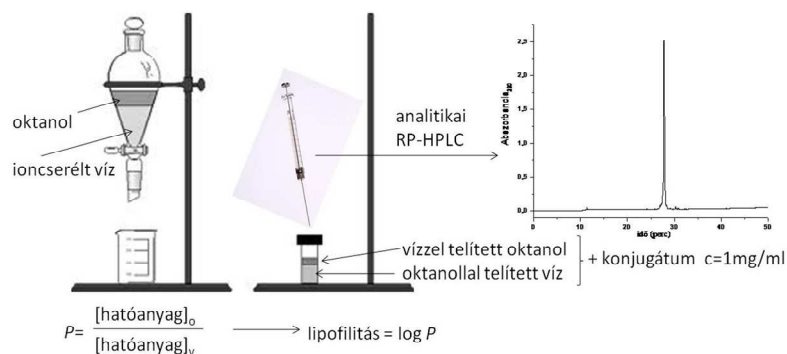
A gyógyszer molekuláknak számos membrán rétegen kell keresztülmenniük ahhoz, hogy célba érjenek és kifejthessék hatásukat. Ezért, ahogy a gyógyszer molekulák – jellemzően kis molekulák – tervezését alapvetően meghatározó Lipinski-féle ötös szabályban

is megfogalmazódott¹⁶⁸, a vegyületek hidrofobitása ($\log P > 5$) a racionális gyógyszertervezés során meghatározó szempont, hiszen ez a tulajdonság jelentősen befolyásolja a vegyületek abszorpcióját, biohasznosíthatóságát, metabolizmusát, kölcsönhatásukat lipid membránokkal. Ennek ellenére valószínűsíthető, hogy a 21. század új gyógyszerei számos pontjában áthágják az „ötös szabályt”. Az előretörő nagy molekulatömegű (5000 Da felett) „biológikumok” (pl.: rekombináns fehérje expresszió termékei, humanizált antitestek) és az 500 – 5000 Da molekulatömeg-tartományba eső peptid gyógyszerek a konvencionális kis molekulás hatóanyagoknál jóval szelektívebbek, így kevesebb mellékhatással rendelkeznek. Bár kismértékű membrán permeabilitásuk és metabolikus instabilitásuknak köszönhetően egyelőre nem alkalmasak a betegek szempontjából kedvező orális adagolásra.¹⁶⁹ Így az ilyen típusú gyógyszerek esetén az egyik legnagyobb kihívás az, hogy miképpen lehet ezeket a vegyületeket orálisan is adagolható formába hozni. Ezeket a szempontokat is szem előtt tartva, de elsősorban a SCFA tartalmú konjugátumok sejtfelvételi és tumorelles hatásának különbségére választ keresve tanulmányoztam a vegyületek lipofilitását.

A vegyületek víz-oktanol megoszlási hányadosának, valamint membránpenetrációjának vizsgálatával továbbra is a konjugátumokban található zsírsavlancok típusa és az *in vitro* biológiai vizsgálatokban tapasztalt eredmények között próbáltam összefüggést találni.

5.1.6.1 A GnRH-III(⁴Lys(X), ⁸Lys(Dau=Aoa)) konjugátumok víz-oktanol megoszlási hányadosának meghatározása RP-HPLC segítségével

A folyadékkromatográfias analízis során egyedül a GnRH-III(⁴Lys(My), ⁸Lys(Dau=Aoa)) (7) konjugátum esetén volt lehetséges a szerves fázisból frakciót detektálni (22. ábra).



22. ábra: A megoszlási hányados meghatározása

A számolt $\log P$ értéke -0,596 volt, amelyből arra következtettem, hogy a konjugátumok lipofilitását nem befolyásolja szignifikánsan a zsírsavlancok jelenléte, a vizsgált vegyületek inkább hidrofíil karakterűek.

5.1.6.2 Mérések Langmuir mérleggel: A GnRH-III(⁴Lys(X), ⁸Lys(Dau=Aoa)) biokonjugátumok penetrációja DPPC monorétegbe

A lipid Langmuir monorétegeket alkalmazó módszerrel a biokonjugátumok és a membránt alkotó lipidek közötti molekuláris kölcsönhatásokat megfelelőképpen jellemezhetjük. A mérések során a biokonjugátumok befolyásolják a lipid filmek stabilitását, szerkezetét, permeabilitását. A kapott kvantitatív információkból határozhatjuk meg a konjugátumok membrán affinitását, kompatibilitását a lipid molekulákkal.¹⁷⁰ A mérések Dr. Kiss Éva és Hórvölgyiné Pető Ida segítségével a Határfelületi- és Nanoszerkezetek Laboratóriumában készültek.

A penetrációs vizsgálatokhoz Langmuir-mérleget használtunk (45. ábra, 108. oldal), melyben a kialakított lipid monoréteget – esetemben dipalmitoil-foszfátidilkolin¹⁷¹ – összenyomtuk, míg elértük a kívánt 15 vagy 25 mN/m felületi feszültség értéket. Az értékek kiválasztását az indokolta, hogy ezen felületi feszültségekkel lehet a sejtmembrán kompaktságát modellezni.¹⁷² A vizsgált biokonjugátumok vizes oldatát a szubfázisba injektáltuk, majd ezután egy órán keresztül vettük fel a felületi feszültség változását. Az így kapott értékeket foglaltam össze a 7. táblázatban.

7. táblázat: GnRH-III(⁴Lys(X), ⁸Lys(Dau=Aoa)) konjugátumok penetrációja ($\Delta\pi$) 15 mN/m és 25 mN/m esetén $23 \pm 0,5$ °C hőmérsékleten, a zsírsavlánc hosszának függvényében (Cn)

Konjugátum	Cn	Lipid filmek felületi feszültsége	
		15 mN/m	25 mN/m
		$\Delta\pi$ 23°C-on (mN/m)	
GnRH-III(⁴ Lys, ⁸ Lys(Dau=Aoa))	0	3,1	2,0
GnRH-III(⁴ Lys(Ac), ⁸ Lys(Dau=Aoa))	2	3,8	1,9
GnRH-III(⁴ Lys(Pr), ⁸ Lys(Dau=Aoa)) (1)	3	3,3	2,1
GnRH-III(⁴ Lys(iBu), ⁸ Lys(Dau=Aoa)) (2)	4	3,8	2,1
GnRH-III(⁴ Lys(nBu), ⁸ Lys(Dau=Aoa)) (3)	4	3,7	1,2
GnRH-III(⁴ Lys(CA), ⁸ Lys(Dau=Aoa)) (4)	4	3,8	1,3
GnRH-III(⁴ Lys(iVA), ⁸ Lys(Dau=Aoa)) (5)	5	5,4	1,7
GnRH-III(⁴ Lys(Hex), ⁸ Lys(Dau=Aoa)) (6)	6	7,4	2,7
GnRH-III(⁴ Lys(My), ⁸ Lys(Dau=Aoa)) (7)	14	17,4	11,5

Standard deviáció $\pm 0,5$ mN/m

Minden konjugátum behatolt a kevésbé sűrű és a tömörebb monorétegbe is. A vártnak megfelelően a penetráció mértéke a sűrűbb lipid rétegbe (25 mN/m) kisebb volt, mint a kevésbé sűrűbe (15 mN/m). A zsírsavláncot nem tartalmazó, az acetilezett, illetve a 3, 4, vagy 5 szén atomos zsírsavas biokonjugátumok közel azonos módon penetráltak. Kismértékű növekedést a kapronsavas vegyület (6) esetén tapasztaltam ($\Delta\pi$: 7,4 15 mN/m-nél; $\Delta\pi$: 2,7 25 mN/m-nél). Jelentős növekedés a mirisztinsavas (C₁₄H₂₈O₂) 7-es vegyületnél volt látható

($\Delta\pi$: 17,4 15 mN/m-nél; $\Delta\pi$: 11,5 25 mN/m-nél). A zsírsavlánc hosszának növekedésével fokozódó penetrációs képességet leginkább csak a mirisztinsavat tartalmazó konjugátum esetén tapasztaltam. Ezért arra a következtetésre jutottam, hogy a sejtfelvétel receptor közvetített módon történik és talán a receptor kötődési affinitás befolyásolja azt. A szerkezetvizsgálati módszerek nem adtak magyarázatot a konjugátumok sejtfelvétele során kapott eredményekre, ezért kiválasztottam az *in vitro* tesztek alapján legígéretesebbnek mutató GnRH-III(⁴Lys(nBu), ⁸Lys(Dau=Aoa)) (3) konjugátumot arra, hogy megvizsgáljam milyen mértékben képes kötődni a humán GnRH-I receptorhoz.

5.1.7 A GnRH-III(⁴Lys(nBu), ⁸Lys(Dau=Aoa)) biokonjugátum ligand kompetíciós kötődési vizsgálata

A GnRH-hatóanyag biokonjugátumok irányított tumorterápiában való alkalmazásának létjogosultságát az az elmélet teszi lehetővé, hogy a konjugátum a GnRH receptorhoz kötődik, majd receptor mediált endocitózissal jut a GnRH receptort túltermelő tumorsejtekbe, majd a lizoszómába jutva a lizoszómális enzimeknek köszönhetően a hatóanyag valamilyen formában felszabadul, hogy kifejthesse hatását. Ezért szükséges, hogy a peptid a biokonjugátum konstrukcióban is megőrizze receptor kötődési képességét. Ezért az *in vitro* vizsgálatokban (*in vitro* citosztatikus hatás, stabilitás, oldékonyság) leghatékonyabbnak bizonyult GnRH-III(⁴Lys(nBu), ⁸Lys(Dau=Aoa)) (3) konjugátum receptor kötődését tanulmányoztuk. A kísérletekben azt szeretnénk volna meghatározni, hogy a biokonjugátumok milyen mértékben képesek a humán hipofízis és a humán prosztata tumor mintákon található GnRH receptorokról leszorítani a radiojelölt [*D*-Trp⁶]GnRH-I-et (triptorelin).¹⁷³ A GnRH-III(⁴Lys(nBu), ⁸Lys(Dau=Aoa)) (3) receptor kötődési affinitását összehasonlítottuk egy GnRH-I analógot, mint irányító molekulát tartalmazó daunorubicin konjugátum ([*D*-Lys⁶(Dau=Aoa)]GnRH-I), valamint a natív GnRH-III-at (GnRH-III(Dau=Aoa)) és a 4-es helyzetben acetilezett lizint tartalmazó (GnRH-III(⁴Lys(Ac), ⁸Lys(Dau=Aoa))) daunorubicin biokonjugátumok receptor kötődésével. A vizsgálatokban mért adatokat a 8. táblázatban foglaltam össze.

A konjugátumok minden esetben nagyobb mértékben kötődtek a humán prosztata tumor mintákhoz, mint a hipofízis szöveten található GnRH-I receptorokhoz. A legalacsonyabb IC₅₀ értékeket (az a koncentráció mennyiség, amely a [¹²⁵I][*D*-Trp⁶]GnRH-I mennyiségének 50%-át gátolja a specifikus kötődésében) a [*D*-Lys⁶(Dau=Aoa)]GnRH-I vizsgálatok során tapasztaltunk (1,62 nM és 0,89 nM). Ezzel szemben a GnRH-III(Dau=Aoa) egy nagyságrenddel kisebb mértékben képes kötődni a receptorhoz (IC₅₀=22,87 nM, illetve 16,51 nM).

8. táblázat: [125 I][D-Trp⁶]GnRH-I receptor kötődésének gátlása humán hipofízis és humán prosztata szöveteken daunorubicin-GnRH konjugátumok által

Konjugátum	IC ₅₀ (nM)	
	humán hipofízis	humán prosztata tumor
[D-Lys ⁶ (Dau=Aoa)]GnRH-I	1,62 ± 0,32	0,89 ± 0,09
GnRH-III(Dau=Aoa)	22,87 ± 1,14	16,51 ± 1,08
GnRH-III(⁴ Lys(Ac), ⁸ Lys(Dau=Aoa))	18,86 ± 1,75	15,73 ± 1,24
GnRH-III(⁴ Lys(nBu), ⁸ Lys(Dau=Aoa)) (3)	9,03 ± 0,78	7,41 ± 0,55

A megadott IC₅₀ értékek (koncentráció mennyiség, mely a [125 I][D-Trp⁶]GnRH-I mennyiségének 50%-át gátolja a specifikus kötődésében) két vagy három független mérés átlagai.

Azonban a 4-es helyzetű szerin acetilezett lizinre történő cseréje kis mértékben, de nem szignifikánsan növelte a kötődési képességet (IC₅₀=18,86 nM, illetve 15,73 nM). Ugyanakkor szignifikáns növekedést tapasztaltunk a vajsavval acilezett változat esetében (IC₅₀=9,03 nM, illetve 7,41 nM). Annak ellenére, hogy a [D-Lys⁶(Dau=Aoa)]GnRH-I jobban képes kötődni a humán GnRH-I receptorhoz, mégsem mutatott jobb *in vitro* antiproliferatív hatást, mint a GnRH-III(⁴Lys(nBu), ⁸Lys(Dau=Aoa)) vegyület. Ez a különbség a különböző sejten belüli folyamatokkal magyarázható. A [D-Lys⁶(Dau=Aoa)]GnRH-I-ben a D-lizin jelenléte valószínűsíthetően megakadályozza a lizin melletti enzimátikus hasadást, így nagyobb, kevésbé hatékony metabolit keletkezhet.

Összevetve a GnRH-III célbajuttató egységet tartalmazó konjugátumok kötődési képességét, elmondhatom, hogy mindkét vizsgálati rendszerben leginkább kötődni képes vegyület a GnRH-III(⁴Lys(nBu), ⁸Lys(Dau=Aoa)) (3) volt. Ez magyarázatul szolgálhat a vegyület nagyobb sejtbejutási képességére és *in vitro* citosztatikus hatására.

5.1.8 A GnRH-III(⁴Lys(nBu), ⁸Lys(Dau=Aoa)) *in vivo* antitumor hatása ortotopikus HT-29 xenografton

Az 5.1 fejezetben eddig bemutatott eredmények alapján a GnRH-III(⁴Lys(nBu), ⁸Lys(Dau=Aoa)) konjugátumot választottuk ki *in vivo* kísérletekhez. A konjugátum *in vivo* antitumor hatásának vizsgálatához ivarérett 6-8 hetes NSG nőstény egerekbe ortotopikusan beültetett HT-29 xenograftot használtunk. Az NSG egér az egyik legsokoldalúbb modell. Előnyei közé tartozik, hogy nincs funkcionális B- és T-sejtje, nincs NK-sejt (természetes ölősejt) aktivitása, humanizálható (érett emberi nyirok- és mieloid sejtek képződnek benne), kiválóan alkalmas transzplantációs kutatásokra (xenograftok beültetése, növesztése).

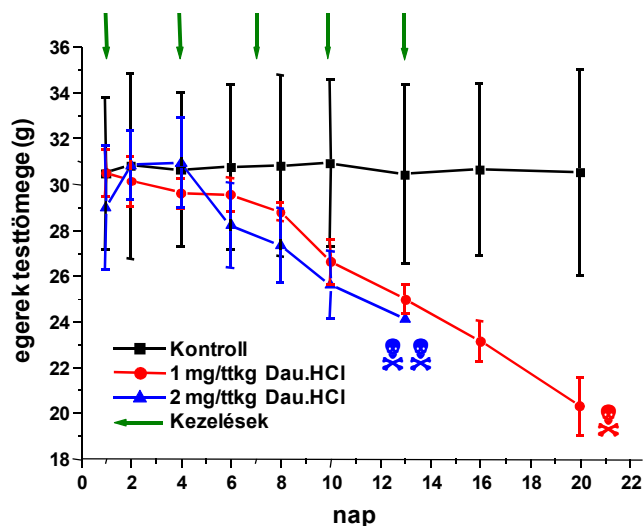
A tumorbeültetéshez azért választottunk ortotopikus implantációt a gyakrabban alkalmazott heterotopikus, szubkután (bőr alatt) rendszerrel szemben, mert ez véleményünk

szerint jobban reprezentál egy valódi tumort. Az ortotopikus modell mikrosebészeti képzettséget igényel, viszont a tumor nem *in situ* karcinóma, nem egy kötőszövetes tokon belül fejlődik. Továbbá a szubkután modellhez képest jól vaszkularizálódik és metasztázisokat képez. Azonban a tumor elhelyezkedése miatt a tumor mérete a kísérlet alatt nem mérhető tolómérővel. A HT-29 humán vastagbél karcinoma invazív, metasztázis képzésre hajlamos, GnRH-receptor pozitív tumor.

A vizsgálatban a GnRH-III(⁴Lys(nBu), ⁸Lys(Dau=Aoa)) (3) hatását a szabad hatóanyag tumornövekedést gátló képességével hasonlítottuk össze.

5.1.8.1 A daunorubicin *in vivo* toxicitásának meghatározása

Előzetesen meghatároztuk a szabad hatóanyag toxicitását egészséges NSG egereken. A 21 napos kísérletben 1 és 2 mg/ttkg daunorubicinnel kezeltünk intraperitoneálisan (hashártya-üregi, *i.p.*) 3-3 egeret. Az állatok 3 naponta öt kezelést kaptak. A 2 mg/ttkg-mal kezelt csoportból a 13. napon két állat, az 1 mg/ttkg-mal kezelt csoportból a 21. napon egy állat pusztult el (23. ábra). A kísérlet eredményei alapján az alacsonyabb, 1 mg/ttkg-mal történő kezelést választottuk a további vizsgálatokhoz. A szabad hatóanyagból az állatok a nagyobb dózist rosszul tolerálták. Ezzel szemben korábbi, daunorubicint oxim-kötésben tartalmazó GnRH-III konjugátumok toxicitás vizsgálatából kiderült, hogy a kísérleti egerek akár ttkg-onkénti 30 mg daunorubicint tartalmazó konjugátumot is jól tolerálnak.⁶⁴



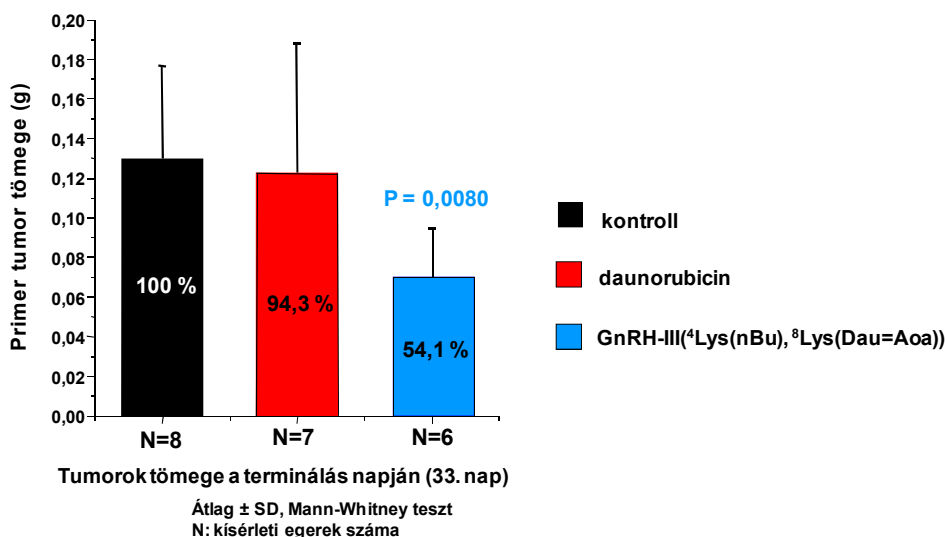
23. ábra: A szabad daunorubicin hatása egészséges NSG egerek testsúlyának változására és élettartamára

5.1.8.2 A GnRH-III(⁴Lys(nBu), ⁸Lys(Dau=Aoa)) *in vivo* tumorellenes hatásának meghatározása

5.1.8.2.1 A GnRH-III(⁴Lys(nBu), ⁸Lys(Dau=Aoa)) *in vivo* tumor növekedést gátló hatása ortotopikus HT-29 xenografton, 1. kísérlet

Az *in vivo* antitumor hatást vizsgáló kísérletben az első kezelést az állatok minden esetben a tumor transzplantációt követő 4. napon kapták *i.p.* adagolással. A további kezeléseket az állatok a konjugátumok esetében négy, a szabad daunorubicint hét naponta kapták. A dózis a konjugátumok esetén 0,68 µmol/egér/injektálás (15 mg/ttkg daunorubicin tartalom), míg a szabad hatóanyag esetében az előzetes toxicitás vizsgálat eredményei alapján 1 mg/ttkg dózist alkalmaztunk. A kísérleti állatok terminálása a tumorbeültetést követő 33. napon következett be.

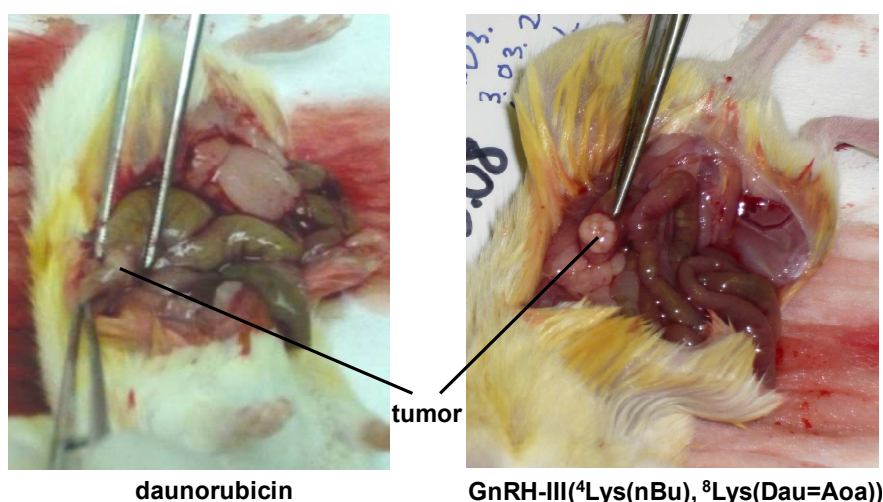
A szabad hatóanyag minimális tumortömeg csökkenést idézett elő (5,7%) a kontroll csoporthoz képest a kísérlet befejezéséig (24. ábra). Ezzel szemben a konjugátum szignifikáns tumornövekedés gátlást (45,9 %) mutatott a kontroll csoporthoz képest. Az ortotopikus modell jellegéből adódóan a tumorok a bélszakaszt jelentősen körbenőtték, ezért eltávolításuk az egerek boncolása során nehézkes volt, a tumorok gyakorlatilag inoperábilisak voltak. Ennek eredményeképpen a nem megfelelően nagyra nőtt tumorszövettel együtt ép bélszövetet is kivágtunk, ami az eredményeket kismértékben csorbítja.



24. ábra: A daunorubicin és a GnRH-III(⁴Lys(nBu), ⁸Lys(Dau=Aoa)) (3) *in vivo* tumorellenes hatása HT-29 vastagbél daganatot tartalmazó egerekben (1. kísérlet)

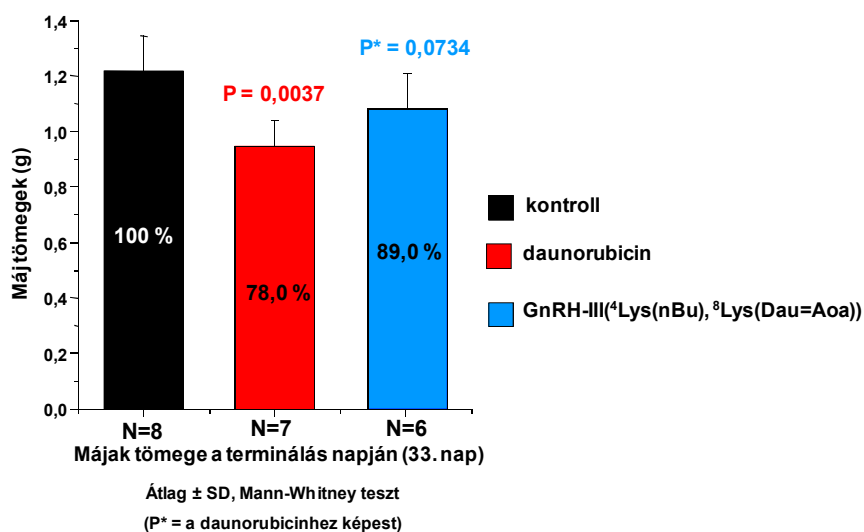
Ez alól kivételt képzett a GnRH-III(⁴Lys(nBu), ⁸Lys(Dau=Aoa)) (3) konjugátummal kezelt állatok feldolgozása. Ugyanis azok a kísérleti állatok, melyek a vajsavas konjugátumot

kapták, operábilisak voltak, a tumor jól elkülönült a bélszövettől (25. ábra).



25. ábra: A tumorok operálhatósága a boncolás során

Vizsgáltuk továbbá a vegyületek makroszkópikus májtoxicitását (26. ábra). A konjugátum a gyakoribb kezelés és a tizenötször nagyobb dózis ellenére is jelentősen gyengébb májtoxicitást mutatott a szabad daunorubicinhez viszonyítva.



26. ábra: A konjugátum és a szabad daunorubicin makroszkópikus májtoxicitás vizsgálata

A kísérlet során szív szövetmintákat gyűjtöttünk, melyeket patológus segítségével vizsgáltunk. Az antraciklinek kardiotoxikus hatását vizsgálva a mikroszkópi metszeteken szívizom és egyéb szöveti károsodást nem tapasztaltunk egyik csoportban sem.

Az *in vivo* eredmények alapján elmondható, hogy a GnRH-III(4Lys(nBu), 8Lys(Dau=Aoa)) (3) szignifikáns tumornövekedés gátló hatást mutatott a szabad hatóanyaghoz képest, de még az operálhatóság szempontjából is figyelemre méltó eredményt kaptunk.

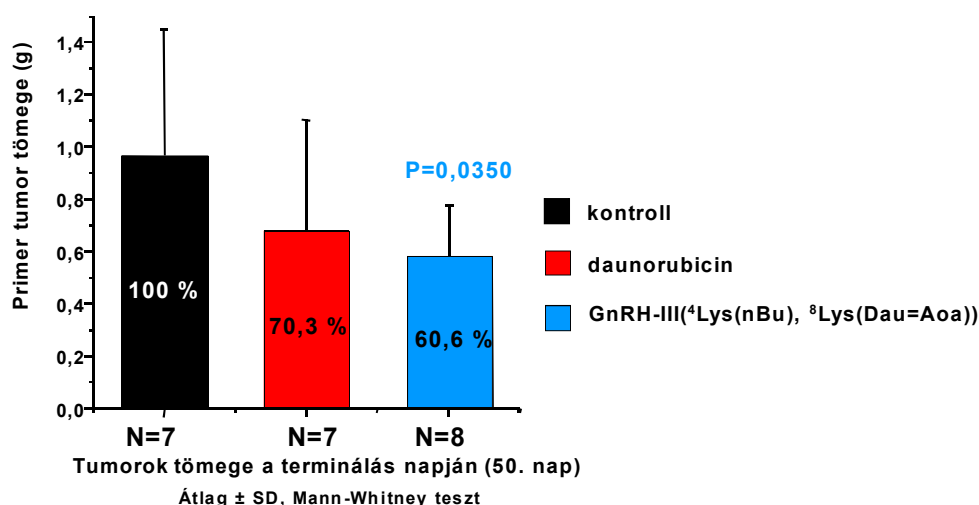
5.1.8.2.2 A GnRH-III(⁴Lys(nBu), ⁸Lys(Dau=Aoa)) (3) *in vivo* antitumor hatása ortotopikus HT-29 xenograftokban, 2. kísérlet

Mivel az első kísérletben a boncolás során azt tapasztaltuk, hogy a kísérleti állatokban a tumorok nem nőttek meg kellőképpen, ami a tumorok eltávolítását is megnehezítette, ezért a vizsgálatot egy, a növekedésében előre tesztelt HT-29 ortotopikus modellen megismételtük.

Az állatok az első kezelést mind a daunorubicin, mind pedig a konjugátum esetében a tumor transzplantációt követő 5. napon kapták intravénásan (*i.v.*). Az első kísérlettel megegyezően a konjugátumokat négy, a szabad daunorubicint (dózis: 1 mg/ttkg) hétnaponta adagoltuk. A dózis a konjugátumok esetén az első öt kezelés során 15 mg/ttkg (daunorubicin tartalomra vonatkoztatva), a hatodik kezeléstől 7,5 mg/ttkg (daunorubicin tartalomra vonatkoztatva) volt. Mivel az állatok farok vénája valószínűsíthetően a trifluoracetát sók hatására begyulladt, ezért az ötödik kezeléstől már *i.p.* adagolásra tértünk át. Ebből okulva, a későbbiekben az *in vivo* kísérletekben a konjugátumok sócseréje szükséges.

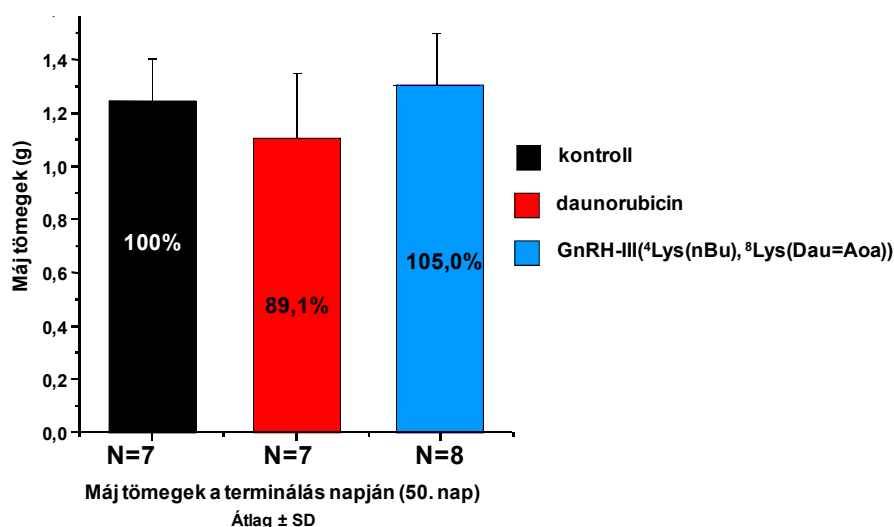
Az első öt kezelés dózis beállító beavatkozás volt, a továbbiak szinttartók. A hatodiktól a tizenharmadik konjugátummal történő kezelés dózisa 7,5 mg/ttkg daunorubicin tartalomra vonatkoztatva. A trifluoracetát sók szövetromboló hatásának enyhítésére a kezelő oldat 5% glükózt tartalmazott. A kísérleti állatok terminálása a tumorbeültetést követő 50. napon következett be.

A második kísérletben a vártnak megfelelő nagyságú tumorok alakultak ki az egerekben. Az első kísérlethez képest a szabad hatóanyag nagyobb mértékű tumortömeg csökkenést idézett elő (29,7%), azonban ez elmaradt a konjugátum okozta szignifikáns tumornövekedés gátlástól (39,4%) (27. ábra).



27. ábra: A daunorubicin és a GnRH-III(⁴Lys(nBu), ⁸Lys(Dau=Aoa)) (3) konjugátum *in vivo* tumorellenes hatása HT-29 vastagbél daganatot tartalmazó egerekben (2. kísérlet)

A vegyületek makroszkópikus májtoxicitását ebben az esetben is megvizsgáltuk (28. ábra). A konjugátum a gyakoribb kezelés és a tizenötször, illetve hét és félszer nagyobb dózis ellenére sem mutott májtoxicitást.



28. ábra: A konjugátum és a szabad daunorubicin makroszkópikus májtoxicitás vizsgálata

A kísérlet során tumor-, máj-, lép-, diafragma-, szív-, nyirokcsomó-, és hasnyálmirigy szövetszövetmintákat gyűjtöttünk, melyeket formalinban és folyékony nitrogénben tároltunk a későbbi feldolgozásig. A mintákat patológus segítségével kiértékeltek, szövetszintű morfológiai változások és metasztázisok után kutatva.

A minták kiértékelése során ebben az esetben sem tapasztaltunk az antraciklinekre jellemző szív- és májszövet károsodást. Viszont a metasztázis képződés kimutatható volt. Sajnálatos módon az első kísérlettel ellentétben egyik csoportban sem sikerült metasztázis gátlást elérnünk a kezelése során. Minden csoportban a máj és a tüdő tartalmazott – makroszkóposan is észlelhető – szóródott metasztázisokat. A lépben minimális metasztázis képződést tapasztaltunk mind a kontroll, mind pedig a kezelt állatok esetében. Viszont a nyirokcsomókon jelentősebb mennyiségben volt kimutatható az áttétképződés (kontroll: hat állatban (87%), Dau: négy állatban (57%), konjugátum: három állatban (38%)). A hasnyálmirigyre csak a kezeletlen kontroll egyedek esetében terjedt át a tumor.

Az *in vivo* kísérletek eredményei alapján elmondható, hogy a GnRH-III(⁴Lys(nBu), ⁸Lys(Dau)) (3) szignifikánsan gátolta a HT-29 primer daganatok növekedését NSG nőstény egerekben.

5.2 Négyes helyzetben vajsavval módosított két daunorubicint tartalmazó

GnRH-III biokonjugátumok szintézise, kémiai és *in vitro* biológiai jellemzése

Az irányított tumorterápia területe rendkívül jól fejlődő ága a rákkutatásnak és már manapság is biztató eredményekkel kecsegtet, azonban sajnos szembe kell néznünk azzal, hogy ennek a területnek is vannak korlátai. Nem tudunk a terápia hatékonyságán javítani egy határon túl, azáltal, ha növeljük a betegeknek adott biokonjugátum mennyiségét, mivel a tumorsejteken lévő receptorok száma korlátozott. Erre a problémára többféle megoldás létezik. Az egyik lehetőség az, ha a célbajuttató egységhez több azonos vagy különböző tumorellesztő szer kapcsolunk. Bár ezen megoldás esetén felléphet az a probléma, hogy a megnövekedett molekulatömeg negatívan befolyásolja az oldékonyságot, esetleg a receptor kötődési képességet is.

5.2.1 A GnRH-III(⁴Lys(nBu), ⁸Lys(Dau=Aoa-X-Lys(Dau=Aoa-X)))

konjugátumok előállítása (X= Ø vagy GFLG)

A konjugátumok irányító molekulájaként kiválasztott [⁴Lys]⁴GnRH-III esetén két hatóanyag beépítésére lehetőség nyílt a lizin oldalláncok felhasználásával. A kutatócsoportunkban már készültek olyan konjugátumok, melyekben a 4-es szerint cserélték lizinre, és ezen lizinen alakítottak ki egy újabb konjugálási pontot. Vagy a 8-as helyzetű lizin ε-aminocsoportjához újabb lizint kapcsolnak, így ezen lizin α- és ε-aminocsoportja is alkalmas lehet konjugálásra. Ezekben az esetekben a biokonjugátumhoz hatóanyagként két azonos (Dau)¹⁷⁴ vagy két különböző (daunorubicin, metotrexát) vegyület kapcsolódott.¹⁷⁵ Én a 4-es helyzetben vajsavval acilezett lizint tartalmazó, jó eredményeket mutató 3-as konjugátumot terveztem továbbfejleszteni több hatóanyagot tartalmazó vegyületté. Ha meg akartam tartani ezt az előnyös konstrukciót, akkor a két hatóanyag kapcsolását, mely esetemben 2 molekula daunorubicint jelent, a 8-as lizinen tudtam csak megvalósítani egy további lizin beépítésével.

5.2.1.1 A GnRH-III(⁴Lys(nBu), ⁸Lys(Aoa-X-Lys(Aoa-X))) peptidek szintézise

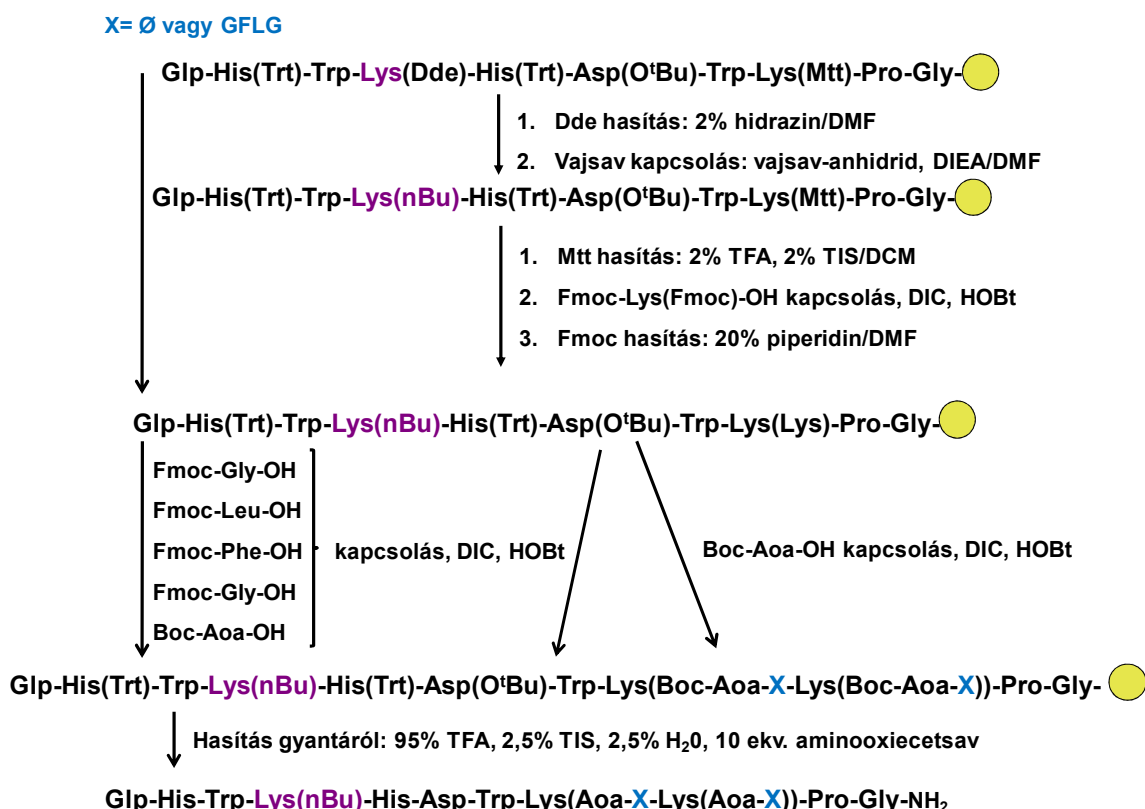
(X= Ø vagy GFLG)

Olyan GnRH-III származékokat állítottam elő, melyek a négyes helyzetben vajsavval acilezett lizint tartalmaztak, a 8-as helyzetben pedig egy újabb lizint építettem be a két hatóanyag molekula kapcsolása érdekében. Két változatot állítottam elő. Az egyik vegyület ((GnRH-III(⁴Lys(nBu), ⁸Lys((Aoa-Gly-Phe-Leu-Gly)-Lys(Aoa-Gly-Phe-Leu-Gly))) esetén katepszin B enzim szubsztrátjaként számon tartott szekvencia felépítése után aminooxiacetil

részletet építettem be, míg a másik vegyületben (GnRH-III(⁴Lys(nBu), ⁸Lys(Aoa-Lys(Aoa))) az aminooxiacetyl funkciós részletekhez közvetlenül kapcsoltam a hatóanyagot.

A peptidek szintézisét szilárdfázisú peptidszintézis módszerével manuálisan Rink-Amid MBHA gyantán Fmoc/^tBu stratégia alkalmazásával valósítottam meg. Hasonlóan az alapvegyületként választott 3-as konjugátumhoz a szekvenciában található két lizin oldallánc védelmére ortogonális védőcsoport stratégiát alkalmaztam. A négyes helyzetben található lizinen lévő Dde védőcsoport eltávolítása révén szabaddá vált ε-aminocsoportot vajsavval acileztem. Az Mtt-csoport eltávolítása után a 8-as pozícióba Fmoc-Lys(Fmoc)-OH aminosavszármazék kapcsolásával újabb konjugálási helyeket alakítottam ki. Mivel a két aminocsoport azonos védelemmel volt ellátva, ezért az Fmoc védőcsoportok hasítása után mindkét aminocsoporton ugyanazt a módosítást hajthattam végre. Az egyik peptid esetén ez a GFLG katepszin B enzim érzékeny spacer peptid és az aminooxiacetyl funkció beépítése volt, míg a másik esetben a GFLG részlet nem került beépítésre.

Az elkészült peptideket a gyantáról TFA-val hasítottam le a megfelelő „gyökfogók” jelenlétében. A nyers termék feldolgozása a korábbi fejezetekben bemutatott módon végeztem.



29. ábra: A (GnRH-III(⁴Lys(nBu), ⁸Lys(Aoa-X-Lys(Aoa-X))) peptidek szintézisének sematikus ábrája (X= Ø vagy GFLG)

A kapott nyers peptideket félpreparatív RP-HPLC-vel tisztítottam, tisztaságukat analitikai RP-HPLC-vel ellenőriztem és azonosításukra ESI-MS-t alkalmaztam (9. táblázat,

Függelék: F19.- F20. ábra). A peptideket az 5.1.1.1-es fejezetben leírtakhoz hasonlóan a tisztítást követően izolálás nélkül felhasználtam a konjugálási reakciókhoz. Termelést ugyancsak nem állt módomban számolni. Azonban a tisztított peptidek analitikai RP-HPLC kromatogramjai alapján elmondhatom, hogy a peptideket közel 95 %-os tisztasággal állítottam elő. A szintéziseket részletesen a Kísérleti rész 6.4.1. pontjában és a 29. ábrán mutatom be.

9. táblázat: GnRH-III(⁴Lys(nBu), ⁸Lys(Aoa-X-Lys(Aoa-X))) peptidek analitikai jellemzése

Vegyület	^a RP-HPLC R _t [perc]	^b ESI-MS MW _{számolt} / MW _{mért}
GnRH-III(⁴ Lys(nBu), ⁸ Lys(Aoa-Lys(Aoa)))	22,5	1641,8 / 1642,1
GnRH-III(⁴ Lys(nBu), ⁸ Lys(Aoa-GFLG-Lys(Aoa-GFLG)))	26,4	2391,0 / 2391,6

^aKnauer HPLC rendszer, oszlop: Phenomenex Luna, C18, 5µm, 100Å; 250x4,6 mm; áramlási sebesség: 1 ml/perc, gradiens: 0-5 perc: 0% B; 50perc: 90% B; Eluensek: A: 0,1% TFA/víz; B: 0,1% TFA/80% acetonitril-20% víz, detektálás: λ=220 nm.

^bBruker Daltonics Esquire 3000+ ioncsapdás tömegspektrométer (Bremen, Germany) (spektrumok felvétele 50–2000 m/z tartományban)

5.2.1.2 Konjugálás daunorubicinhez, oxim-kötés kialakítása: GnRH-III(⁴Lys(nBu), ⁸Lys(Dau=Aoa-X-Lys(Dau=Aoa-X))) konjugátumok előállítása

A konjugálási reakciók és a reakciók feldolgozása az 5.1.1.2-es pontban leírtakkal megegyező körülmények szerint végeztem, részletes leírása a Kísérleti rész 6.5.1.2-es pontjában megtalálható. A konjugátumok analízisének eredményeit a 10. táblázatban és a *Függelék: F21.- F22. ábráin* foglaltam össze.

10. táblázat: A GnRH-III(⁴Lys(nBu), ⁸Lys(Dau=Aoa-X-Lys(Dau=Aoa-X))) biokonjugátumok analitikai jellemzése

Vegyület	^a RP-HPLC R _t [perc]	^b ESI-MS MW _{számolt} / MW _{mért}
GnRH-III(⁴ Lys(nBu), ⁸ Lys(Dau=Aoa-Lys(Dau=Aoa))) (8)	28,5	2661,8 / 2662,8
GnRH-III(⁴ Lys(nBu), ⁸ Lys(Dau=Aoa-Gly-Phe-Leu-Gly-Lys(Dau=Aoa-Gly-Phe-Leu-Gly))) (9)	33,1	3410,8 / 3411,3

^aKnauer HPLC rendszer, oszlop: Phenomenex Luna, C18, 5µm, 100Å; 250x4,6 mm; áramlási sebesség: 1 ml/perc, gradiens: 0-5 perc: 0% B; 50perc: 90% B; Eluensek: A: 0,1% TFA/víz; B: 0,1% TFA/80% acetonitril-20% víz, detektálás: λ=220 nm.

^bBruker Daltonics Esquire 3000+ ioncsapdás tömegspektrométer (Bremen, Germany) (spektrumok felvétele 50–2000 m/z tartományban)

5.2.1.3 A GnRH-III(⁴Lys(nBu), ⁸Lys(Dau=Aoa-X-Lys(Dau=Aoa-X))) konjugátumok *in vitro* citosztatikus hatásának meghatározása MCF-7 és HT-29 sejteken

A vegyületek *in vitro* citosztatikus hatását MCF-7 és HT-29 sejteken MTT-tesztrel vizsgáltam 6 órás kezelési időt alkalmazva az 5.1.3. pontban leírtakkal megegyezően. A továbbiakban az *in vitro* citosztatikus hatásvizsgálatok körülményeit csak abban az esetben mutatom be, ha az eltér a korábbiaktól.

Minden esetben a kísérletekhez bemért mennyiségeket a konjugátumokra és nem pedig daunorubicin tartalomra számoltam ki. Összehasonlítottam a távtartó egységet tartalmazó és nem tartalmazó vegyület eredményeit, valamint összevettem a kapott értékeket az előző fejezetben leírt kiindulási vegyület, a GnRH-III(⁴Lys(nBu), ⁸Lys(Dau=Aoa)) (3) eredményeivel. Az IC₅₀ értékeket a 11. táblázatban foglaltam össze.

Az enzimlabilis távtartó részlettel módosított 9-es vegyület nagyobb mértékben gátolta az MCF-7 sejtek osztódását. Ez a különbség a HT-29 sejteken nem volt megállapítható, mivel a vegyületek IC₅₀ értéke minden esetben nagyobbak bizonyult az alkalmazott legmagasabb koncentrációnál.

11. táblázat: A GnRH-III(⁴Lys(nBu), ⁸Lys(Dau=Aoa-X-Lys(Dau=Aoa-X))) konjugátumok *in vitro* citosztatikus hatása különböző tumorsejteken (X= Ø vagy GFLG)

Vegyület	IC ₅₀ (μM)	
	MCF-7	HT-29
GnRH-III(⁴ Lys(nBu), ⁸ Lys(Dau=Aoa-Lys(Dau=Aoa))) (8)	7,7±0,4	>50
GnRH-III(⁴ Lys(nBu), ⁸ Lys(Dau=Aoa-GFLG-Lys(Dau=Aoa-GFLG))) (9)	1,3±0,4	>50
GnRH-III(⁴ Lys(nBu), ⁸ Lys(Dau=Aoa)) (3)	0,7±0,2	2,2±0,6
Dau.HCl	0,2±0,1	0,1±0,0

A vegyületek MCF-7 sejteken mérve a korábbi eredményekhez hasonlóan jobb hatást mutattak, mint a HT-29 sejteken. A méréseket nagyban befolyásolta a vegyületek rossz oldékonysága sejtenyészítő médiumokban. Ez a tapasztalat különösen a HT-29 sejtekhez alkalmazott RPMI-1640 sejtenyészítő médiumban volt látványos. Valószínűleg ennek köszönhető, hogy nem mutattak a vegyületek citosztatikus hatást a vizsgált koncentráció tartományban.

Ezenfelül annak ellenére, hogy a vizsgált vegyületekben két molekula daunorubicin szerepel, a konjugátumok nem mutattak szignifikánsan jobb hatást, mint a kiindulási GnRH-III(⁴Lys(nBu), ⁸Lys(Dau=Aoa)) (3) konjugátum, amelyben csak egy daunorubicin található.

Bár a konjugátumok rossz oldékonysága erre is magyarázatul szolgálhat.

Az oldékonysági probléma kiküszöbölésére a 8-as és 9-es biokonjugátumok etilén-glikol származékkal módosított analógjait is előállítottam.

5.2.2 A GnRH-III(⁴Lys(nBu), ⁸Lys(Dau=Aoa-X-O₂Oc-Lys(Dau=Aoa-X-O₂Oc))) konjugátumok (X= Ø vagy GFLG) előállítása

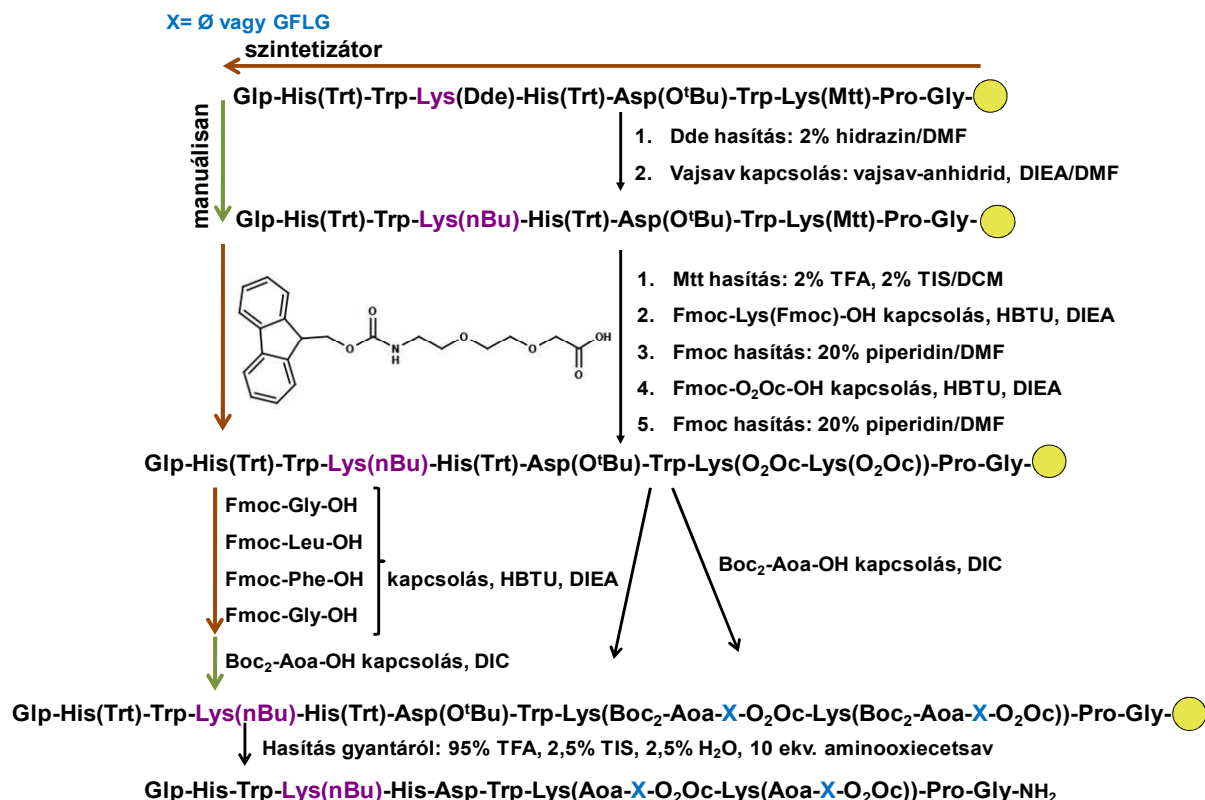
Korábbi kutatások alapján ismert, hogy a GnRH-III 8-as helyzetében található lizin oldalláncának módosítása nem befolyásolja a peptid tumorelles hatását, sőt endokrin aktivitása jelentősen csökkent. Ebből kiindulva a kutatócsoportunkban olyan szimmetrikus GnRH-III dimerek és GnRH-III-hatóanyag konjugátumok készültek, amelyekben a kötés kialakítására a 8-as helyzetű lizin oldalláncát használták. A dimer vegyületek megnövekedett enzim rezisztenciával rendelkeztek tripszinnel szemben és a tumorsejtekbe is nagyobb mértékben jutottak be, mint a monomer GnRH-III.^{61,62} A dimerek esetében a megnövekedett molekulatömeg és a lizin hidrofíli aminocsoportjának acilezése következtében a vegyületek oldékonysága jelentősen lecsökkent. Ugyancsak ez volt jellemző a 4-es helyzetben acilezett lizint tartalmazó konjugátumokra. Ha további daunorubicint vagy GFLG spacer szekvenciát építünk be a konjugátumokba, az ugyancsak az oldékonyság csökkenéséhez vezethet a nagyobb molekulatömeg és/vagy a hidrofób spacer szekvencia miatt. Doktori munkám során én is hasonló tapasztalatokra tettem szert, ezért a két molekula daunorubicint tartalmazó biokonjugátumok etilén-glikolt tartalmazó változatait is elkészítettem jobb víz oldékonyságú és ezáltal hatékonyabb vegyületeket remélve.

5.2.2.1 A GnRH-III(⁴Lys(nBu), ⁸Lys(Aoa-X-O₂Oc)-Lys(Aoa-X-O₂Oc))) peptidek szintézise (X= Ø vagy GFLG)

A peptidek szintézisét szilárdfázisú peptidszintézis módszerével valósítottam meg részben peptid szintetizátor segítségével, részben manuálisan a 30. ábrán feltüntetett szintézisséma szerint Rink-Amid ChemMatrix gyantán Fmoc/^tBu stratégia alkalmazásával. Első lépésben az alaplánc felépítését végeztem Prelude automata peptidszintetizátorral (Protein Technologies) a barcelonai Pompeu Fabra Egyetemen David Andreu kutatócsoportjában. A lizinek esetén ugyancsak ortogonális védelmet alkalmaztam. Az előző pontban leírtakkal megegyező módon végeztem mind a 4-es, mind a 8-as pozíció módosítását (vajsavval acilezés, Fmoc-Lys(Fmoc)-OH beépítése).

A 8-as helyzetű lizin oldalláncára beépített lizin aminocsoportjait védő Fmoc-védőcsoport hasítása után mind az α-, mind pedig az ε-aminocsoporton ugyanazt a módosítást

hajthattam végre. Az első peptid esetén ez az etilén-glikol származék, majd a GFLG katepszin B enzimre specifikus peptidlánc, végül pedig az aminooxiacetil részlet beépítése volt, míg a másik esetben a GFLG peptid szekvencia nem került beépítésre. Mind a hasítási, mind a feldolgozási lépések az előző pontban leírtakkal azonos módon zajlottak. A peptidek szintézisének részletes leírása a Kísérleti rész 6.4.2.1 fejezetében található.



30. ábra: A GnRH-III(⁴Lys(nBu), ⁸Lys(Aoa-X-O₂Oc-Lys(Aoa-X-O₂Oc))) peptidek szintézisének menete (X= Ø vagy GFLG)

A kapott nyers peptideket félpreparatív RP-HPLC-vel tisztítottam, tisztaságukat analitikai RP-HPLC-vel ellenőriztem és azonosításukra ESI-MS-t alkalmaztam (12. táblázat, Függelék: F23.-F24. ábra).

12. táblázat: GnRH-III(⁴Lys(nBu), ⁸Lys(Aoa-O₂Oc-X-Lys(Aoa-O₂Oc-X))) peptidek analitikai jellemzése

Vegyület	^a RP-HPLC R _t [perc]	^b ESI-MS MW _{számolt} / MW _{mért}
GnRH-III(⁴ Lys(nBu), ⁸ Lys(Aoa-O ₂ Oc-Lys(Aoa-O ₂ Oc)))	23,3	1932,3 / 1932,9
GnRH-III(⁴ Lys(nBu), ⁸ Lys(Aoa-Gly-Phe-Leu-Gly-O ₂ Oc-Lys(Aoa-Gly-Phe-Leu-Gly-O ₂ Oc)))	27,2	2681,0 / 2681,2

^aKnauer HPLC rendszer, oszlop: Phenomenex Luna, C18, 5µm, 100Å; 250x4,6 mm; áramlási sebesség: 1 ml/perc, gradiens: 0-5 perc: 0% B; 50 perc: 90% B; Eluensek: A: 0,1% TFA/víz; B: 0,1% TFA/80% acetonitril-20% víz, detektálás: λ=220 nm.

^bBruker Daltonics Esquire 3000+ ioncsapdás tömegspektrométer (Bremen, Germany) (spektrumok felvétele 50–2000 m/z tartományban)

A peptideket az 5.1.1.1-es fejezetben leírtakhoz hasonlóan a tisztítást követően izolálás nélkül felhasználtam a konjugálási reakciókhoz. A tisztított peptidek analitikai RP-HPLC kromatogramjai alapján a peptideket közel 95 %-os tisztasággal állítottam elő.

5.2.2.2 Konjugálás daunorubicinhez, oxim-kötés kialakítása: GnRH-III(⁴Lys(nBu), ⁸Lys(Dau=Aoa-X-O₂Oc-Lys(Dau=Aoa-X-O₂Oc))) konjugátumok előállítása

A konjugálási reakciók és a reakciók feldolgozása az 5.1.1.2.-es pontban leírtakkal megegyező körülmények között végeztem, részletes leírása a Kísérleti rész 6.4.2.2.-es pontjában megtalálható. A megtisztított konjugátumok tisztaságát analitikai RP-HPLC-vel ellenőriztem, valamint ESI-MS-rel azonosítottam (13. táblázat, Függelék: **F25.-F26. ábra**).

13. táblázat: A GnRH-III(⁴Lys(nBu), ⁸Lys(Dau=Aoa-X-O₂Oc-Lys(Dau=Aoa-X-O₂Oc))) biokonjugátumok analitikai jellemzése

Vegyület	^a RP-HPLC R _f [perc]	^b ESI-MS MW _{számolt} / MW _{mért}
GnRH-III(⁴ Lys(nBu), ⁸ Lys(Dau=Aoa-O ₂ Oc-Lys(Dau=Aoa-O ₂ Oc))) (10)	27,0	2952,2 / 2952,9
GnRH-III(⁴ Lys(nBu), ⁸ Lys(Dau=Aoa-Gly-Phe-Leu-Gly-O ₂ Oc-Lys(Dau=Aoa-Gly-Phe-Leu-Gly-O ₂ Oc))) (11)	30,7	3701,0 / 3701,4

^aKnauer HPLC rendszer, oszlop: Phenomenex Luna, C18, 5µm, 100Å; 250x4,6 mm; áramlási sebesség: 1 ml/perc, gradiens: 0-5 perc: 0% B; 50perc: 90% B; Eluensek: A: 0,1% TFA/víz; B: 0,1% TFA/80% acetonitril-20% víz, detektálás: λ=220 nm.

^bBruker Daltonics Esquire 3000+ ioncsapdás tömegspektrométer (Bremen, Germany) (spektrumok felvétele 50–2000 m/z tartományban)

5.2.3 A GnRH-III(⁴Lys(nBu), ⁸Lys(Dau=Aoa-X-Y-Lys(Dau=Aoa-X-Y))) konjugátumok oldékonysági vizsgálatai (X=Ø vagy GFLG, Y=Ø vagy O₂Oc)

A biokonjugátumok oldékonyságának meghatározására kétféle módszert alkalmaztam. A mérések célja az etilén-glikol származékok oldékonyságot befolyásoló szerepének meghatározása volt.

5.2.3.1 A GnRH-III(⁴Lys(nBu), ⁸Lys(Dau=Aoa-X-Y-Lys(Dau=Aoa-X-Y))) konjugátumok oldhatóság vizsgálata tömegmérés alapján

A Peptidkémiai Kutatócsoportban Dr. Bartos Ádám molekulák oldékonyságának vizsgálatára tömegmérésen alapuló módszert dolgozott ki.^{176,177,178} Az ő protokollját követve vizsgáltam desztillált vízben azt, hogy milyen mértékben befolyásolja a GnRH-

III(⁴Lys(nBu),⁸Lys(Dau=Aoa-X-Y Lys(Dau=Aoa-X-Y))) (X=Ø vagy GFLG, Y=Ø vagy O₂Oc) konjugátumok vízdoldhatóságát az etilén-glikol származék jelenléte. A vizsgálatok eredményeit a 14. táblázatban foglaltam össze.

Bár a bemutatott retenciós idő értékekből látszik (14. táblázat), hogy az etilén-glikol származékot tartalmazó konjugátumok a kromatográfiás körülmények között hidrofílebbek, jobban oldódnak vízben, mint az oldhatóságot segítő részlet nélküli analógjaik, azonban az oldódásuk mértékét vizsgáló mérések során csak minimális különbséget fedeztem fel a kapott eredmények segítségével. Mind a négy konjugátum desztillált vízben rendkívül jól oldódott.

Mivel a vegyületek oldhatóságának a biológiai mérések során van igazán jelentősége, ezért a kísérleteket az *in vitro* citosztatikus mérésekkel azonos körülmények között is elvégeztem.

14. táblázat: GnRH-III(⁴Lys(nBu),⁸Lys(Dau=Aoa-X-Y-Lys(Dau=Aoa-X-Y))) konjugátumok oldékonysága

Biokonjugátum	R _t [perc]	oldhatóság 25°C-on (mg/ml H ₂ O)
GnRH-III(⁴ Lys(nBu), ⁸ Lys(Dau=Aoa-Lys(Dau=Aoa))) (8)	28,5	26,0
GnRH-III(⁴ Lys(nBu), ⁸ Lys(Dau=Aoa-GFLG-Lys(Dau=Aoa-GFLG))) (9)	33,1	24,5
GnRH-III(⁴ Lys(nBu), ⁸ Lys(Dau=Aoa-O ₂ Oc-Lys(Dau=Aoa-O ₂ Oc))) (10)	27,0	25,3
GnRH-III(⁴ Lys(nBu), ⁸ Lys(Dau=Aoa-GFLG-O ₂ Oc-Lys(Dau=Aoa-GFLG-O ₂ Oc))) (11)	30,7	25,1

A vizsgálat protokolljában meghatározott 30 mg konjugátumot desztillált víz helyett az *in vitro* vizsgálatok során alkalmazott DMEM sejttenyésztő médiumban próbáltam meg feloldani. Azonban ez a mennyiség 1,2 ml médiumban nem oldódott fel. A sejttenyésztő médium különböző szervesen sókat, aminosavakat, vitaminokat, cukrokat, HEPES-t, stb. tartalmazó vizes oldat.

5.2.3.2 A GnRH-III(⁴Lys(nBu),⁸Lys(Dau=Aoa-X-Y-Lys(Dau=Aoa-X-Y))) konjugátumok oldékonyság vizsgálata folyadékkromatográfiás módszeren alapuló oldékonyság vizsgálata

Mivel kis mennyiségek esetén a tömegmérés nem elég precíz módszer, a tapasztalt különbségek nem szignifikánsak, ezért a konstanzi egyetemen dolgozó kollégák (Dr. Marilena Manea és Aline Pauschert) által kidolgozott, RP-HPLC-n alapuló módszerrel is megvizsgáltam a konjugátumok oldékonyságát.

Első lépésben különböző koncentrációjú vizes oldatokból vettem fel standard sorozatot,

majd a minta oldatokat injektáltam a HPLC készülékre. A mérések eredményeit a 15. táblázatban foglaltam össze.

15. táblázat: GnRH-III(⁴Lys(nBu),⁸Lys(Dau=Aoa-X-Y-Lys(Dau=Aoa-X-Y))) oldhatósága DMEM sejttenyésztő médiumban

Oldékonyság	8	9	10	11
µg	8,7	1,1	26,7	7,9
µmol	3,27*10 ⁻³	3,2*10 ⁻⁴	9,04*10 ⁻³	2,13*10 ⁻³
%	16,4	1,6	45,1	10,6

A vizsgálatok eredményei alapján arra a következtetésre jutottam, hogy az etilén-glikol részlet beépítése a molekulákba nagymértékben növelte azok oldódását a sejttenyésztő médiumban. Továbbá, ha a GFLG távtartó egységet tartalmazó, illetve nem tartalmazó konjugátum párokat hasonlítom össze, akkor a mérési eredmények alapján azt a következtetést vonhatom le, hogy a spacer szekvencia rontotta a vegyületek oldhatóságát. Azonban az oldékonyság csökkenés az etilén-glikol származékot is tartalmazó konjugátum esetén kisebb volt.

5.2.4 A GnRH-III(⁴Lys(nBu),⁸Lys(Dau=Aoa-X-O₂Oc-Lys(Dau=Aoa-X-O₂Oc))) konjugátumok *in vitro* citosztatikus hatásának vizsgálata

Az etilén-glikol egységgel kiegészített 10-es és 11-es analógok *in vitro* citosztatikus hatásának vizsgálatát a 8-as és 9-es vegyületek mérésével megegyezően végeztem el MTT-teszttel (6 órás kezelési idő, MCF-7 és HT-29 sejteken). A bemért mennyiségek ugyancsak a konjugátumokra és nem pedig daunorubicin tartalomra vonatkoztak. Az IC₅₀ értékeket a 16. táblázatban foglaltam össze.

16. táblázat: A GnRH-III(⁴Lys(nBu),⁸Lys(Dau=Aoa-X-O₂Oc-Lys(Dau=Aoa-X-O₂Oc))) konjugátumok IC₅₀ értékének meghatározása MTT-teszt segítségével különböző tumorsejteken (X=Ø vagy GFLG)

Vegyület	IC ₅₀ (µM)	
	MCF-7	HT-29
GnRH-III(⁴ Lys(nBu), ⁸ Lys(Dau=Aoa-O ₂ Oc-Lys(Dau=Aoa-O ₂ Oc))) (10)	0,9±0,4	>50
GnRH-III(⁴ Lys(nBu), ⁸ Lys(Dau=Aoa-GFLG-O ₂ Oc-Lys(Dau=Aoa-GFLG-O ₂ Oc-))) (11)	0,5±0,1	2,1±0,7
GnRH-III(⁴ Lys(nBu), ⁸ Lys(Dau=Aoa)) (3)	0,7±0,2	2,2±0,6
Dau.HCl	0,2±0,1	0,1±0,0

A két sejttípus közti különbség itt is megmutatkozott, HT-29 sejteken kevésbé voltak

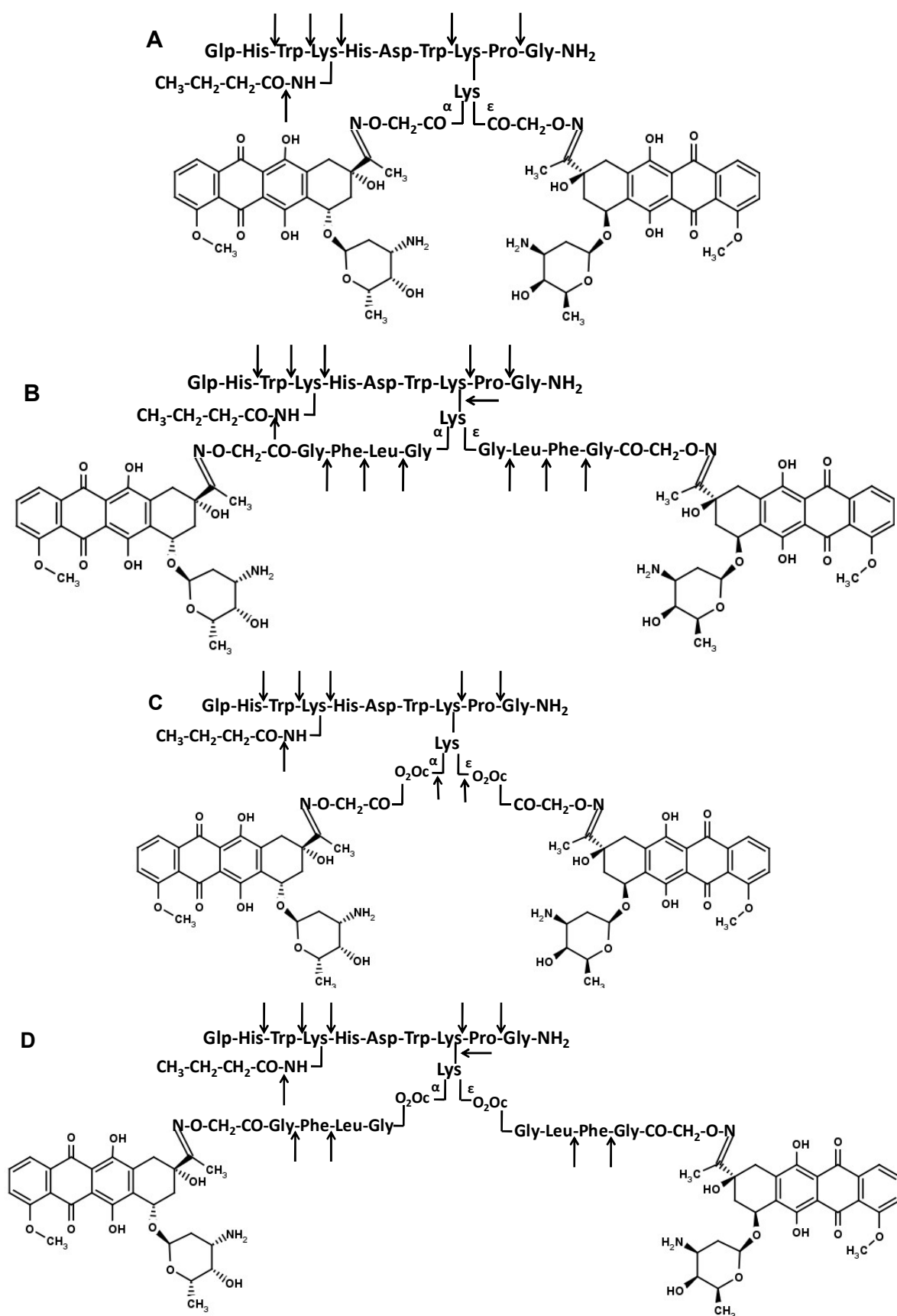
hatásosak a konjugátumok, mint MCF-7 sejteken.

Bár a kiindulási 3-as vegyület hatását nem haladta meg egyik etilén-glikol egységgel módosított konjugátum sem, azonban az etilén-glikol egységet nem tartalmazókhöz képest citosztatikus hatásbeli javulást tapasztaltam, különösen a 11-es biokonjugátum esetén. Ha ebben az esetben nem is sikerült jobb eredményt elérni, az itt tapasztalt hatások más molekulák esetén hasznosíthatóak lehetnek.

5.2.5 A GnRH-III(⁴Lys(nBu), ⁸Lys(Dau=Aoa-X-Y-Lys(Dau=Aoa-X-Y))) konjugátumok patkány máj lizoszóma homogenátum jelenlétében végzett lebomlási vizsgálata LC-MS módszerrel

A vegyületek etilén-glikol részlet hatására bekövetkező oldékonyságának növelése részben magyarázatul szolgálhat az *in vitro* citosztatikus hatás fokozódására. Azonban szerettem volna tanulmányozni, hogy az etilén-glikol származék jelenléte befolyásolja-e a vegyületek metabolizmusát is, ami ugyancsak szerepet játszhat a tumorelles hatások kifejtésében.

A lebomlási vizsgálatokat az 5.1.2.3. pontban leírtakkal megegyezően végeztem el. Az emésztés során kapott eredményeket a Függelékben található **F27. ábrán** és a 3. táblázatban foglaltam össze, továbbá az azonosított hasítási helyeket a 31. ábrán mutatom be. A mérések eredményeiből megállapítható, hogy mind a négy biokonjugátumot a patkány máj lizoszóma homogenátum enzimeit megemésztették, különböző peptid fragmenteket és daunorubicin tartalmú metabolitokat eredményezve. Ahogyan a GnRH-III(⁴Lys(X), ⁸Lys((Dau=Aoa))) és más korábban előállított és vizsgált konjugátumok esetén is tapasztaltam, az LC-MS spektrumokban nem azonosítottam szabad daunorubicint.^{125,179} Mind a négy konjugátum esetén a <EHWK-OH peptid fragment volt azonosítható (m/z 581,3 (1+)), jelezve, hogy a vajsav lehasad a konjugátumról, ahogy azt a GnRH-III(⁴Lys(nBu), ⁸Lys(Dau=Aoa)) esetén is tapasztaltam. A felszabadult vajsav a tumorsejtekben apoptózist indukálhat.^{4,110,157} A legkisebb daunorubicin tartalmú metabolit az egyes konjugátumok esetén nagyban függött a vegyület szerkezetétől. A 8-as biokonjugátum esetében: H-Lys(Dau=Aoa-Lys(Dau=Aoa))Pro-OH (m/z 1537,6 (1+)), a 9-es esetén: Dau=Aoa-Gly-OH (m/z 659,2 (1+)), amely vegyület igazoltan képes a DNS-hez kötődni¹²⁵, 10-es konjugátum esetén ez a Dau=Aoa-O₂Oc-OH (m/z 746,3 (1+)), míg a 11-es vegyületnél szintén a Dau=Aoa-Gly-OH (m/z 659,2 (1+)) volt a legkisebb hatóanyag tartalmú fragment. Az etilén-glikol származékkal, illetve a GFLG távtartóval rendelkező konjugátumok nagyobb mértékben degradálódtak.

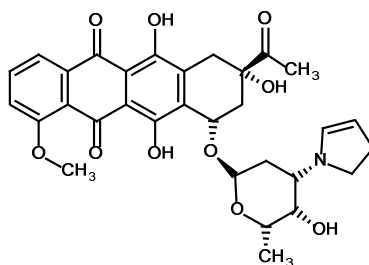


31. ábra: A GnRH-III(⁴Lys(nBu), ⁸Lys(Dau=Aoa-X-Y-Lys(Dau=Aoa-X-Y))) konjugátumok patkány máj lizoszóma homogenátum jelenlétében képződött és detektált hasítási helyei (A: X=Ø, Y=Ø, B: X=GFLG, Y=Ø, C: X=Ø, Y=O₂Oc, D: X=GFLG, Y=O₂Oc)

5.3 Négyes helyzetben vajsavval módosított 2-pirrolino-daunorubicin-GnRH-III biokonjugátum szintézise, kémiai és *in vitro* biológiai jellemzése

Továbbra is a rendkívül hatékony GnRH-III(⁴Lys(nBu), ⁸Lys(Dau=Aoa)) konjugátumból kiindulva szerettem volna még hatásosabb vegyületet előállítani. Ezt oly módon, hogy a daunorubicin helyett annak jóval hatékonyabb származékát, a 2-pirrolino-daunorubicint (32. ábra, 2.1.4-es fejezet^{126,128,129}) konjugáltam a GnRH-III(⁴Lys(nBu), ⁸Lys(Aoa)) peptidhez.

Az A. V. Schally laboratóriumában kifejlesztett AN-207-ben a 2-pirrolino-doxorubicin észter-kötéssel kapcsolódik a [D-Lys⁶]GnRH-I irányító molekulához, amelyből az észter-kötés labilitása miatt a hatóanyag könnyen felszabadul nemkívánt mellékhatásokat eredményezve.



32. ábra: 2-pirrolino-daunorubicin

Ezért a tervezett konjugátumban a hatóanyagot a [⁴Lys(nBu)]-GnRH-III irányító molekulához a széles pH tartományban stabil oxim-kötéssel kapcsoltam.

5.3.1 A GnRH-III(⁴Lys(nBu), ⁸Lys(PyrDau=Aoa)) konjugátumok előállítása

A konjugátumhoz szükséges GnRH-III(⁴Lys(nBu), ⁸Lys(Aoa)) peptidet az 5.1.1.1. és 6.3.1.1-es fejezetekben leírtak szerint állítottam elő, dolgoztam fel és analizáltam.

A peptid és a daunorubicin között az oxim-kötés kialakítását a korábbi vegyületek esetén alkalmazott körülményekkel kíséreltem meg (0,2M NH₄OAc, pH=5,0). Azonban a reakció elegy tisztítása során kapott HPLC frakciók ESI-MS azonosítása során kiderült, hogy a reakció nem játszódott le. Ezért próba reakciót végeztem desztillált vízben. A reakció elegyből analitikai RP-HPLC kromatogramot vettem fel. A kapott frakciók összegyűjtésével és azok tömegspektrometriai analízisével megállapítottam, hogy a kívánt reakció sikeresen végbement. Ennek következtében a reakció újbóli végrehajtásához desztillált vizet alkalmaztam. A biokonjugátumot félpreparatív RP-HPLC-vel tisztítottam, majd analitikai RP-HPLC-vel és tömegspektrométerrel analizáltam (17. táblázat, Függelék: F28. ábra).

17. táblázat: A GnRH-III(⁴Lys(nBu), ⁸Lys(PyrDau=Aoa)) konjugátum analitikai jellemzése

Vegyület	^a RP-HPLC R _t [perc]	^b ESI-MS MW _{számolt} / MW _{mért}
GnRH-III(⁴ Lys(nBu), ⁸ Lys(PyrDau=Aoa)) (12)	28,5	2004,1 / 2004,0

^aKnauer HPLC rendszer; oszlop: Phenomenex Luna, C18, 5µm, 100Å; 250x4,6 mm; áramlási sebesség: 1 ml/perc, gradiens: 0-5 perc: 0% B; 50perc: 90% B; Eluensek: A: 0,1% TFA/víz; B: 0,1% TFA,80% acetonitril-20% víz, detektálás: λ=220 nm.

^bBruker Daltonics Esquire 3000+ ioncsapdás tömegspektrométer (Bremen, Germany) (spektrumok felvétele 50–2000 *m/z* tartományban)

5.3.2 A GnRH-III(⁴Lys(nBu), ⁸Lys(PyrDau=Aoa)) konjugátum *in vitro* citosztatikus hatásának meghatározása MTT-teszt segítségével

A 2-pirrolino-daunorubicint tartalmazó konjugátum *in vitro* citosztatikus hatását HT-29 és MCF-7 sejteken vizsgáltam MTT-teszttel 6 órás kezelési időt alkalmazva (18. táblázat).

18. táblázat: GnRH-III(⁴Lys(nBu), ⁸Lys(PyrDau=Aoa)) biokonjugátumok *in* IC₅₀ értékének meghatározása MTT-teszt segítségével HT-29 és MCF-7 sejteken

Konjugátum	IC ₅₀ (µM)	
	HT-29	MCF-7
GnRH-III(⁴ Lys(nBu), ⁸ Lys(Dau=Aoa)) (3)	2,2 ±0,6	0,7 ±0,2
GnRH-III(⁴ Lys(nBu), ⁸ Lys(PyrDau=Aoa)) (12)	0,2 ±0,0	0,02 ±0,01
2-pirrolino-daunorubicin	0,0053	0,0089
Dau.HCl	0,1 ±0,0	0,2 ±0,1

A GnRH-III(⁴Lys(nBu), ⁸Lys(PyrDau=Aoa)) (12) konjugátum *in vitro* citosztatikus hatása közel azonos volt, mint a szabad daunorubiciné, ugyanakkor egy nagyságrenddel hatásosabb, mint a daunorubicint tartalmazó kiindulási konjugátum. Bár ez az eredmény a 2-pirrolino-daunorubicin hatását nem közelítette meg.

5.4 Négyes helyzetben vajsavval módosított daunorubicin-GnRH-I és daunorubicin-GnRH-II biokonjugátumok szintézise és *in vitro* jellemzése

Vizsgálni kívántam, hogy a GnRH-I illetve a GnRH-II esetén is növeli-e a hatékonyságot a vajsav beépítése daunorubicin tartalmú konjugátumokba. Ezért előállítottam [*D*-Lys⁶]GnRH-I és a [*D*-Lys⁶]GnRH-II vajsavval acilezett származékainak oxim-kötésben daunorubicint tartalmazó konjugátumait. A GnRH szuperagonista [*D*-Lys⁶]GnRH-I analógot számos peptid-hatóanyag konjugátumban alkalmazták irányító molekulaként¹⁸⁰¹⁸¹, amelyekben a különböző hatóanyagok (melfalán, ciszplatin, metotrexát, doxorubicin) a 6-os

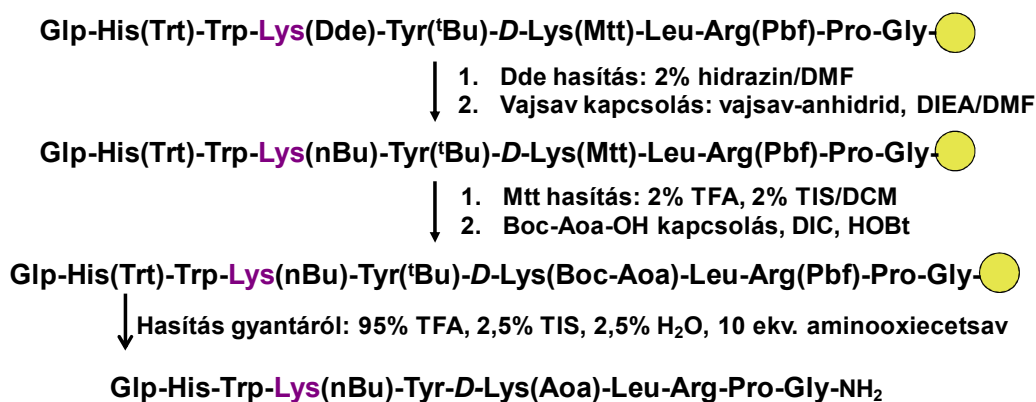
helyzetű *D*-lizinen keresztül kapcsolódnak az önmagában is tumorellenes hatású peptidhez. Közülük az egyik leghatékonyabb az A. V. Schally laboratóriumában kifejlesztett AN-152 (2.1.2-es fejezet).^{32,126,182}

A hatos pozíciójú glicin cseréje különböző *D*-aminosavakra, GnRH-II esetén is megengedett, ugyanis nem befolyásolja a peptidek receptor kötődését a natív szekvenciához képest. Az agonista [*D*-Lys⁶]GnRH-II szintén tumorellenes hatással rendelkezik. A méhnyálkahártya és petefészkek tumorok esetén ez a hatás még szignifikánsan nagyobb is, mint ami a GnRH-I szuperagonista triptorelinnel elérhető.^{43,45,183}

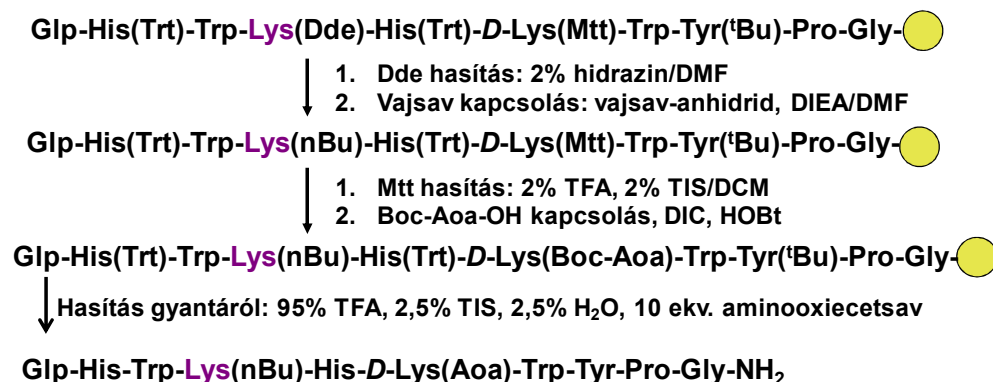
A [*D*-Lys⁶]GnRH-II-analógot szintén alkalmazzák irányító molekulaként is. Rahimipour és mtsai. hatóanyagként a szemikinin származék 4,5,7-trihidrox-9,10-dioxoantracén-1-karbonsavat kapcsolták hozzá, annak érdekében, hogy a fotóérzékenyítő konjugátumot irányított fotodinamikus terápiában alkalmazzák.¹⁸⁴

5.4.1.1 A GnRH-I(⁴Lys(nBu), *D*-⁶Lys(Aoa)) és a GnRH-II(⁴Lys(nBu), *D*-⁶Lys(Aoa)) peptidek szintézise

A GnRH-I és GnRH-II analógok szintézisét manuálisan szilárdfázisú peptidszintézis módszerével valósítottam meg (33.-34. ábra).



33. ábra: A GnRH-I(⁴Lys(nBu), *D*-⁶Lys(Aoa)) peptid szintézisének sematikus ábrája



34. ábra: A GnRH-II(⁴Lys(nBu), *D*-⁶Lys(Aoa)) peptid szintézisének sematikus ábrája

19. táblázat: GnRH-I(⁴Lys(nBu), D-⁶Lys(Aoa)) és GnRH-II(⁴Lys(nBu), D-⁶Lys(Aoa)) peptidek analitikai jellemzése

Vegyület	^a RP-HPLC R _t [perc]	^b ESI-MS MW _{számolt} / MW _{mért}
GnRH-I(⁴ Lys(nBu), D- ⁶ Lys(Aoa))	23,9	1438,0 / 1437,0
GnRH-II(⁴ Lys(nBu), D- ⁶ Lys(Aoa))	24,5	1491,0 / 1491,4

^aKnauer HPLC rendszer; oszlop: Phenomenex Luna, C18, 5µm, 100Å; 250x4,6 mm; áramlási sebesség: 1 ml/perc, gradiens: 0-5 perc: 0% B; 50perc: 90% B; Eluensek: A: 0,1% TFA/víz; B: 0,1% TFA/80% acetonitril-20% víz, detektálás: λ=220 nm.

^bBruker Daltonics Esquire 3000+ ioncsapdás tömegspektrométer (Bremen, Germany) (spektrumok felvétele 50–2000 *m/z* tartományban)

5.4.1.2 A [D-Lys⁶]GnRH-I és a [D-Lys⁶]GnRH-II származékok konjugálása daunorubicinhez oxim-kötéssel keresztül

A peptidek és a daunorubicin közötti oxim-kötés kialakítása a korábbiakhoz hasonlóan 0,2 M-os NH₄OAc pufferben (pH=5,0) ment végbe. A reakcióelegy feldolgozását és analízisét is a korábbi oxim-kötésű vegyületek esetén alkalmazottakkal megegyező módon valósítottam meg (20. táblázat, Függelék: **F31.-F32. ábra**).

20. táblázat: GnRH-I(⁴Lys(nBu), D-⁶Lys(Dau=Aoa)) és GnRH-II(⁴Lys(nBu), D-⁶Lys(Dau=Aoa)) konjugátumok analitikai jellemzése

Vegyület	^a RP-HPLC R _t [perc]	^b ESI-MS MW _{számolt} / MW _{mért}
GnRH-I(⁴ Lys(nBu), D- ⁶ Lys(Dau=Aoa)) (13)	27,0	1946,9 / 1947,0
GnRH-II(⁴ Lys(nBu), D- ⁶ Lys(Dau=Aoa)) (14)	27,5	2001,4 / 2000,8

^aKnauer HPLC rendszer; oszlop: Phenomenex Luna, C18, 5µm, 100Å; 250x4,6 mm; áramlási sebesség: 1 ml/perc, gradiens: 0-5 perc: 0% B; 50perc: 90% B; Eluensek: A: 0,1% TFA/víz; B: 0,1% TFA/80% acetonitril-20% víz, detektálás: λ=220 nm.

^bBruker Daltonics Esquire 3000+ ioncsapdás tömegspektrométer (Bremen, Germany) (spektrumok felvétele 50–2000 *m/z* tartományban)

5.4.2 A GnRH-I(⁴Lys(nBu), D-⁶Lys(Dau=Aoa)) és a GnRH-II(⁴Lys(nBu), D-⁶Lys(Dau=Aoa)) konjugátumok *in vitro* citosztatikus hatásának vizsgálata

A vegyületek *in vitro* citosztatikus hatását HT-29 sejteken 6 órás kezelést alkalmazva, a korábbi vizsgálatokhoz hasonlóan MTT-tesztel határoztam meg. Az eredményeket összehasonlítottam a kutatócsoportban korábban készült vajsavat nem tartalmazó GnRH-I(D-⁶Lys(Dau=Aoa)) és GnRH-II(D-⁶Lys(Dau=Aoa)) mérése során kapott adatokkal (21. táblázat). A GnRH-II alapú 13-as konjugátum esetében a változtatás az *in vitro* citosztatikus hatás szignifikáns növekedésével járt. A GnRH-I konjugátum esetén a vajsav beépítése minimális, nem szignifikáns javulást eredményezett az *in vitro* citosztatikus hatásban.

21. táblázat: Különböző GnRH származékokat tartalmazó daunorubicin biokonjugátumok IC₅₀ értékének meghatározása MTT-teszt segítségével HT-29 sejteken

Konjugátum	citosztázis (HT-29) IC ₅₀ (μM)
GnRH-I(⁴ Lys(nBu), D- ⁶ Lys(Dau=Aoa)) (13)	16,9 ± 4,6
GnRH-II(⁴ Lys(nBu), D- ⁶ Lys(Dau=Aoa)) (14)	3,9 ± 0,8
GnRH-III(⁴ Lys(nBu), ⁸ Lys(Dau=Aoa)) (3)	2,0 ± 0,6
GnRH-I(D- ⁶ Lys(Dau=Aoa))	20,2 ± 5,0
GnRH-II(D- ⁶ Lys(Dau=Aoa))	19,3 ± 3,1
Dau.HCl	0,1 ± 0,0

Érdemes megjegyezni, hogy ez a módosítás a GnRH-III konjugátumok esetében növelheti a konjugátum stabilitását. Így mivel az *in vitro* citosztatikus hatás nem romlik, ez a módosítás előnyösen használható más GnRH-I származék előállításánál is. A négyes helyzetben vajsavval acilezett GnRH-III-daunorubicin konjugátum hatása mindkettőnél jobb volt, ami feltehetően a keletkező metabolitok különbségében keresendő. Ezt megvizsgálandó további enzimes emésztéseket és az azok során képződő metabolitok meghatározását tervezem.

5.5 Irányított tumorterápiában alkalmazható kurkumin tartalmú vegyület előállítása

5.5.1 GnRH-III-kurkumin biokonjugátum előállítása klikk-reakcióval

A konjugátum kialakítását a manapság egyre népszerűbbé váló azid-alkin 1,3-dipoláris (Huisgen) cikloaddíciós reakció¹⁸⁵, biológiai rendszerekben is alkalmazható változatával, klikk-reakció segítségével alakítottam ki^{186,187} Ehhez azid-funkcióval rendelkező peptidet és alkin-funkcióval rendelkező kurkumin származékot állítottam elő.

5.5.1.1 A 8-as pozícióban azid-csoportot tartalmazó GnRH-III analóg előállítása

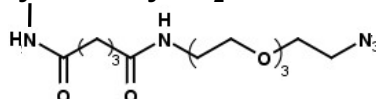
A 8-as pozícióban azid csoportot tartalmazó távtartóegységgel meghosszabbított GnRH-III származékot manuálisan Rink-Amid MBHA gyantán állítottam elő Fmoc/^tBu stratégiával (35. ábra), az 5.1 fejezetben leírt szintézisekhez hasonlóan.

A klikk-reakcióhoz szükséges azid-funkció kialakítására lehetőség lett volna azido-lizin (Fmoc-Lys(N₃)-OH) származék beépítésével is. Viszont a hatóanyagként választott kurkumin rendkívül hidrofób természete miatt a vízzoldékonyság növelése érdekében az azid részletet egy etilén-glikol távtartóegységgel (11-azido-3,6,9-trioxaundekán-1-amin) kívántam megoldani a következőkben bemutatottak szerint.

Glp-His(Trt)-Trp-Ser(^tBu)-His(Trt)-Asp(O^tBu)-Trp-Lys(ivDde)-Pro-Gly

1. Lys oldallánc védőcsoport hasítása
2. glutársav-anhidrid kapcsolása
3. 11-azido-3.6.9-trioxaundekán-1-amin kapcsolása
N3CCCCOCCCCOCCCCOCCCCN
4. peptid hasítása gyantáról

Glp-His-Trp-Ser-His-Asp-Trp-Lys-Pro-Gly-NH₂



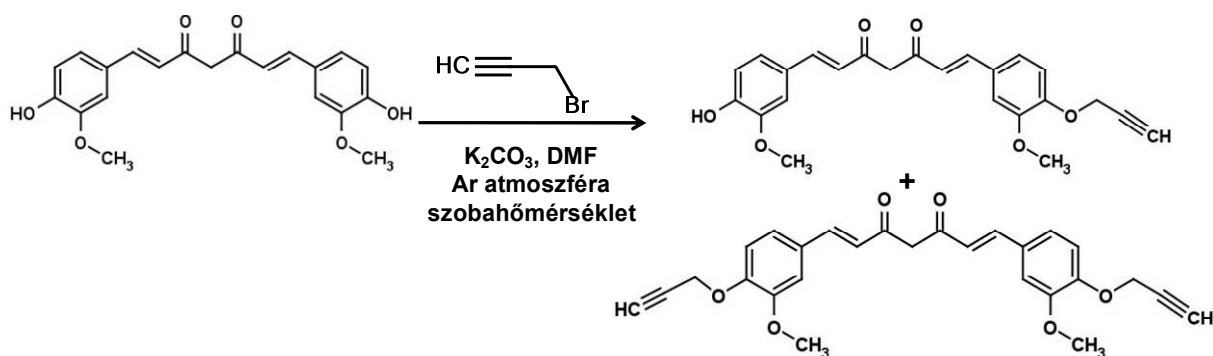
35. ábra: Azid-funkcionalizált GnRH-III származék szintézise

Az alaplánc felépítése után a 8-as helyzetben található lizin ϵ -aminocsoportjáról eltávolítottam az ivDde védőcsoportot, majd glutársav anhidriddel acileztem, így alakítva ki a karboxil funkciót az oldalláncon. Ily módon azid végcsoporttal rendelkező etilén-glikol származékot tudtam kapcsolni amid-kötés kialakításával a szilárd hordozón.¹⁸⁸ Ezután a 8-as helyzetben azid-csoporttal módosított GnRH-III származékot TFA-val hasítottam le a gyantáról megfelelő „gyökfogók” jelenlétében. A nyerterméket liofilizálással izoláltam, majd RP-HPLC-vel tisztítottam, tisztaságát analitikai RP-HPLC-vel ellenőriztem. A tisztított termék ESI-MS adatai a számított értékkel egyezést mutattak (22. táblázat). Az előállított peptidszármazék analitikai RP-HPLC kromatogramja és tömegspektruma a *Függelékben* található (F33. ábra).

5.5.1.2 Kurkumin-monoalkin származék előállítása

A klikk-reakcióhoz szükséges alkin reakciópartner szerepét a kurkumin fitokémiai vegyület monoalkin származéka töltötte be.

A kurkumin propargil származékát propargil-bromid segítségével állítottam elő argon atmoszférában szervesetlen bázis jelenlétében dimetil-formamid oldószerben, szobahőmérsékleten (36. ábra).¹⁸⁹



36. ábra: Kurkumin-alkin származék előállítása

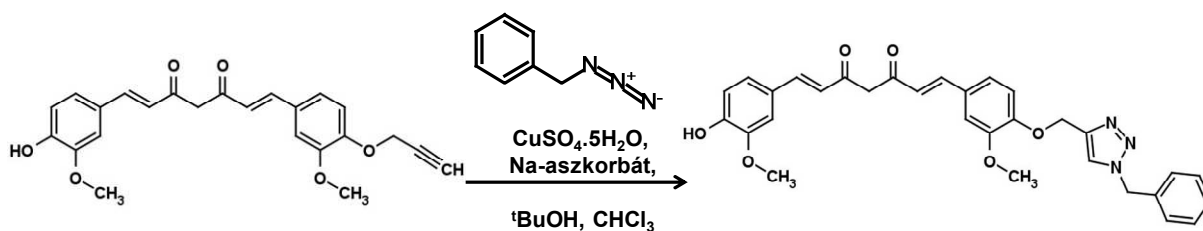
A szimmetrikus kurkumin hidroxilcsoportjának éteresítése során mind a mono- mind pedig a dialkin származékot megkaptam, amely származékokat a folyadékkromatográfiás tisztítás során elválasztottam, és tömegspektrometria segítségével azonosítottam (*Függelék: F34. ábra*).¹⁸⁹

Az analitikai vizsgálatok alapján a kurkumin körülbelül 60 %-a alakult át. Az átalakult mennyiség körülbelül 80%-a monoalkin, 20%-a pedig dialkin származék volt. A nyertermékből csak a következő reakciókhoz szükséges mennyiséget tisztítottam meg, ezért nem volt lehetőségem termelést számolni.

5.5.1.3 Klikk-reakció: GnRH-III(⁸Lys(kurkumin-triazol)) előállítása

A klikk-reakciót a mára már klasszikussá váló „Sharpless klikk körülmények” között hajtottam végre. A réz(I) katalizálta eljárásban réz-szulfátot alkalmaztam nátrium-aszkorbát, mint redukáló ágens mellett.

Első lépésben a kurkumin-monoalkin vegyületet próba reakcióban alkalmaztam (37. ábra).



37. ábra: Próba reakció: kurkumin-monoalkin származék és benzil-azid klikk-reakciója

A kurkumin-származékot benzil-aziddal reagáltattam, és a reakciót analitikai RP-HPLC-vel követtem (*Függelék F35. ábra*). Az összegyűjtött analitikai RP-HPLC-ről összegyűjtött frakciókból ESI-MS segítségével azonosítottam a komponenseket. (22. táblázat, *Függelék: F36. ábra*). A tömegspektrometriás mérésekből megállapítottam, hogy a reakció végbement.

Ezután a kísérletet a GnRH-III azid származékával is elvégeztem. A szintézis részletes leírása a Kísérleti rész 6.7.1.1 fejezetében található, valamint a szintézis lépéseit 38. ábrán foglaltam össze. A GnRH-III(⁸Lys(kurkumin)) vegyületet sikerült izolálnom a reakcióelegyből, bár rendkívül kis mennyiségben. A reakció sikertelenségének egyik lehetséges oka az, hogy a peptidben található hisztidinek komplexálják a réz-ionokat, amelyek így nem tudják betölteni a katalizátor szerepét.

származékának rendkívül rossz víz oldékonysága. Bár a törzsoldathoz a vegyületeket először dimetil-szulfoxidban oldottam, majd azt hígítottam sejttenyésztő médiummal, a hígítás során a vegyületek mégis kicsapódtak. Ez magyarázatot adhat a vegyületek magas IC₅₀ értékeire.

A kurkumin-GnRH-III konjugátum előállításának viszonylagos sikertelensége és a biológiai vizsgálatból nyert tapasztalatok alapján arra a következtetésre jutottam, hogy későbbi kurkuminnal kapcsolatos munkám során a célom az lesz, hogy a hatóanyagot úgy juttassam be önmagában a szervezetbe, hogy az nagyfokú biohasznosíthatósággal járjon. Erre megfelelő módszer lehet a kurkumin irányító molekulával funkcionalizált (pl. GnRH-III) liposzómába zárása.¹⁹⁰

5.6 Daunorubicin tartalmú szomatosztatin analóg biokonjugátumok szintézise és *in vitro* tumorelles határuk vizsgálata

A célzott tumorterápiában célszerű olyan irányító molekulát választani, amely önmagában is gátolja a tumornövekedését, ezáltal fokozza a hozzákapcsolt gyógyszermolekula hatását. Azonban a tumorsejtek receptoraihoz kötődő peptid hormonok többsége serkenti a tumor növekedését. Ez alól az előző fejezetekben tárgyalt gonadotropin-releasing hormonon kívül a szomatosztatin is kivételt képez. A szomatosztatin származékok közül az A. V. Schally laboratóriumában kifejlesztett RC-121 (2.4.2 fejezet) molekulát és Kéri György csoportjában fejlesztett heptapeptid szomatosztatin agonista TT-232 analógot választottam a konjugátumok irányító molekulájaként.

A konjugátumokban a hatóanyag szerepét a daunorubicin tölti be, amelyet különböző kötés típusokkal – hidrazon, oxim – kapcsoltam a célbajuttató vegyülethez. A hatóanyagot a peptid N-terminálisára építettem be, mivel az irodalmi előzmények alapján a vegyületek aktivitását nem befolyásolja néhány módosítás sem az N-, sem a C-terminálisán.¹⁹¹ Ezt az állítást igyekeztem én is alátámasztani a mérési eredményeimmel.

5.6.1 Az oxim-kötésű daunorubicin-RC-121 származék előállítása (Dau=Aoa-D-Phe-c[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys]-Thr-NH₂)

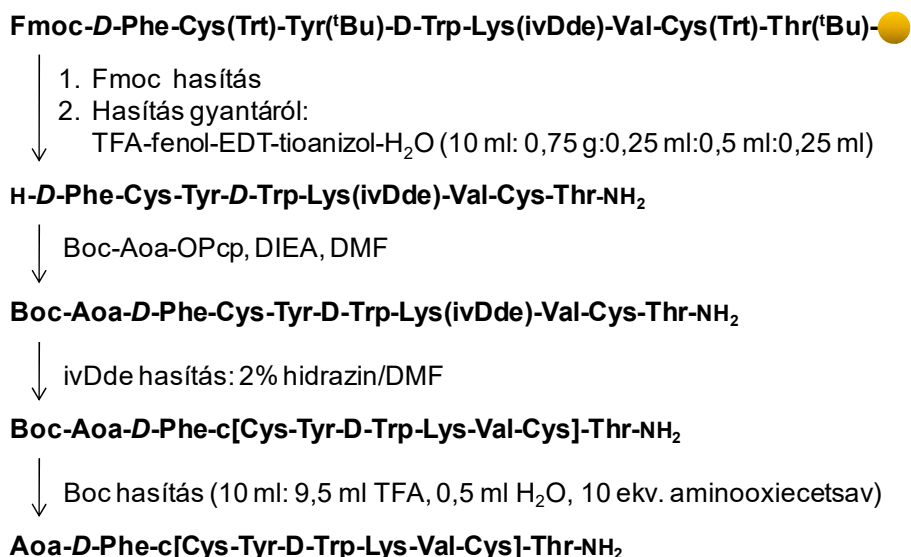
Az RC-121 önmagában is jelentős tumorelles hatással rendelkező szomatosztatin származék. A vegyület az irányított tumorterápiában célbajuttató molekulaként is alkalmazható, mivel nagy affinitással kötődik az sstr2, sstr3 és sstr5 receptorokhoz. A vegyületből 2-pirrolino-doxorubicinnal képzett konjugátum (AN-238) tumorelles hatását önmagában és a [D-Trp⁶]GnRH-I analóggal kombinációban is vizsgálták.

5.6.1.1 Az N-terminálisán aminooxiacetyl-csoporttal módosított RC-121 származék előállítása (Aoa-D-Phe-c[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys]-Thr-NH₂)

Az N-terminálisán aminooxiacetyl-csoporttal módosított RC-121 molekulát a korábbiakban bemutatott aminooxiacetyllezett GnRH származékok szintéziséhez hasonlóan kíséreltem meg előállítani. A Boc-csoporttal védett aminooxiacetsavat gyantán kapcsoltam a felépített szomatostatin származék N-terminálisára. Azonban a hasított peptid nem tartalmazta az előállítani kívánt lineáris peptidet, csak a +40 Da tömeg egységgel nagyobb acetonnal elreagált mellékterméket. Ezután megkíséreltem a peptidet úgy előállítani, hogy a szilárd hordozón a lineáris prekursor peptidet az aminooxiacetyl részlet nélkül felépítettem, majd lehasítottam. Ezt követően a peptidet ciklizáltam és Boc-Aoa-OH származékot kapcsoltam hozzá BOP reagens segítségével oldatban. Bár a reakció sikeres volt, a terméket nagyon alacsony termeléssel sikerült előállítanom. Ezért újabb szintézisutat kerestem. A legsikeresebbnek bizonyult módszert mutatom be részletesen (39. ábra).

Első lépésben a lineáris szomatostatin analógot állítottam elő manuálisan Fmoc/^tBu stratégiával Rink-Amid MBHA gyantán. A peptidlánc felépítését az N-terminális Fmoc védőcsoport hasítása, majd a peptid gyantáról történő hasítása követte. A lehasított peptidet az azonosítást követően (24. táblázat, Függelék F39. ábra) tisztítás nélkül használtam fel.

A második lépésben a peptidet Boc-aminooxiacetsav pentaklórfenilészterével reagáltattam oldatban szobahőmérsékleten. (39. ábra).



39. ábra: Aminooxiacetyllezett RC-121 származék szintézise

A reakcióelegy bepárlását követően RP-HPLC tisztítást alkalmaztam, majd a kapott frakciókat analizáltam (24. táblázat, Függelék F40. ábra). Ezután a Boc-védett lineáris

peptidről az ivDde védőcsoportot hasítottam le 2% hidrazin/DMF oldatban a peptid 1 mg/ml koncentrációját alkalmazva, miközben a ciszteinek tiol csoportjai között kialakult a ciklus diszulfid-híd kötésen keresztül. (24. táblázat, Függelék: F41. ábra).

A reakcióelegy tisztítása és analízise után a Boc védőcsoportot távolítottam el a peptidről trifluorecetsavval a megfelelő „gyökfogók” és aminosavak karboxil-csoport megkötő reagens mellett. A peptideket tisztítás után liofilizálás nélkül használtam fel a konjugálási reakcióban az aminosav-csoport érzékenysége miatt (24. táblázat, Függelék F42. ábra).

5.6.1.2 Konjugálás: oxim-kötés kialakítása: Dau=Aoa-RC-121 előállítás

Az oxim-kötésű vegyület kialakításához a korábbiakban alkalmazott körülmények között végeztem el a reakciókat, 0,2 M-os (pH=5,0) ammónium-acetát pufferben, szobahőmérsékleten daunorubicin 50%-os feleslegével.

24. táblázat: RC-121 származékok analitikai jellemzése

Vegyület	^a RP-HPLC R _f [perc]	^b ESI-MS MW _{számolt} / MW _{mért}	Termelés % főtermék
H-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys(ivDde)-Val-Cys-Thr-NH ₂	36,3	1253,6 / 1254,05	n.a.
Boc-Aoa-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys(ivDde)-Val-Cys-Thr-NH ₂	44,5	1427,7 / 1427,4	75%
Boc-Aoa-D-Phe-c[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys]-Thr-NH ₂	33,1	1218,6 / 1218,5	47%
Aoa-D-Phe-c[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys]-Thr-NH ₂	26,4	1118,6 / 1118,8	n.a.
Dau=Aoa-D-Phe-c[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys]-Thr-NH ₂ (16)	31,5	1628,0 / 1628,1	n.a.

^aKnauer HPLC rendszer, oszlop: Phenomenex Jupiter C18, 5 µm, 300 Å, 250 mm x 4,6 mm; áramlási sebesség: 1 ml/perc; gradiens: 0-5 perc: 0% B; 50 perc: 90 % B; Eluensek: A: 0,1% TFA/víz; B: 0,1% TFA, 80% acetonitril-20% víz, detektálás: λ=220 nm.

^bBruker Daltonics Esquire 3000+ ioncsapdás tömegspektrométer (Bremen, Germany) (spektrumok felvétele 50–2000 m/z tartományban)

A reakció lejártszódását követően az elegyet RP-HPLC-vel tisztítottam, a kapott frakciókat liofilizálás után analizáltam. Az analízisek eredményei a 24. táblázatban találhatóak, valamint a Függelékben ábrázoltam azt (F43. ábra)

5.6.1.3 Dau=Aoa-RC-121 *in vitro* citosztatikus hatása

A daunorubicint tartalmazó szomatostatint analóg konjugátum *in vitro* citosztatikus hatását HT-29 és MCF-7 sejteken vizsgáltam MTT-tesztel 6 órás kezelési időt alkalmazva (25. táblázat).

25. táblázat: A Dau=Aoa-RC-121 IC₅₀ értékének meghatározása MTT-teszt segítségével HT-29 és MCF-7 sejteken

Vegyület	IC ₅₀ (μM)	
	HT-29	MCF-7
Dau=Aoa-RC-121 (16)	24,5±0,5	4,3
Dau.HCl ¹⁶⁰	2,0	0,2

A konjugátum egy nagyságrenddel rosszabb hatást mutatott mindkét vizsgált sejten, mint a szabad hatóanyag.

5.6.2 A TT-232 alapvegyület és a hidrazon-kötésű daunorubicin-TT-232 konjugátum szintézise

Az *in vitro* citosztázis tesztekben a TT-232 konjugátumok hatását a célbajuttató egység, az öt tagú gyűrűs heptapeptid TT-232 hatásához hasonlítottam, ezért a TT-232 előállítása is szükséges volt. A hidrazin csoporttal funkcionalizált analóghoz is a TT-232 lineáris prekursor peptidet használtam fel, ezért a két vegyület szintézisét egy pontban írom le.

5.6.2.1 A referencia vegyület TT-232 (H-D-Phe-c[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Cys]-Thr-NH₂) és a hidrazin csoporttal funkcionalizált TT-232 származék peptid előállítása

A mindkét molekulához szükséges TT-232 heptapeptidet manuálisan szilárdfázisú peptidszintézis módszerével állítottam elő Fmoc/^tBu stratégia alkalmazásával. A peptidet Rink-Amid MBHA gyantán építettem fel a 6.2.1.-es pontban leírtak szerint. Az alaplanc felépítése után a gyantát kettéosztottam, és a szintézist a gyantamennyiség felén folytattam tovább. A peptid N-terminálisát hidrazin funkcióval láttam el, borostyánkősav monohidrazid származék (Boc-NH-NH-CO-(CH₂)-CO-OPcp) felhasználásával (40. ábra).

A lineáris prekursor peptid lehasítása során azt tapasztaltam, hogy az alkalmazott 1,5 órás hasítási idő nem volt elegendő a teljes mennyiség lehasítására, mivel a vártnál kisebb mennyiségű nyers peptidhez jutottam. Ezért a megismételt szintézis esetén a peptidet háromszor egymás után, minden alkalommal a korábban is alkalmazott összetételű, de friss hasítóeleggyel, megnövelt reakcióidővel 2,5 órán keresztül hasítottam (26. táblázat).

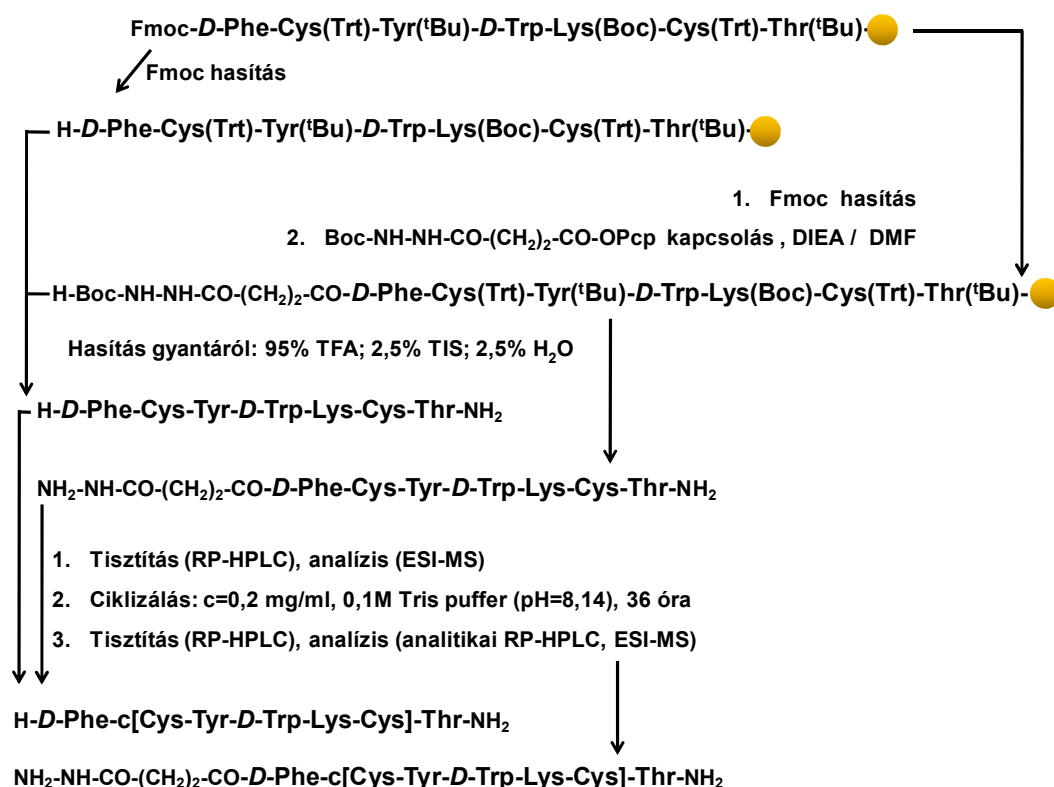
26. táblázat: A TT-232 lineáris prekursor peptid hasítása

	hasítás 1.	hasítás 2.	hasítás 3.
nyers H-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Cys-Thr-NH ₂ peptid	464,4 mg	112,5 mg	65,2 mg

Mivel ez a protokoll sikeresnek bizonyult, ezért a további szintézisek során ezt a módszert alkalmaztam. A nyerstermékeket liofilizálással izoláltam.

A tisztításukat félpreparatív RP-HPLC-vel végeztem. A peptidek tisztaságát analitikai RP-HPLC-vel ellenőriztem. A tisztított termékek mért ESI-MS adatai a számított értékekkel egyezést mutattak (27. táblázat).

Az előállított peptidszármazékok analitikai RP-HPLC kromatogramjai és tömegspektrumai a Függelékben (F44.-F45. ábra) találhatóak.



40. ábra: A TT-232 és a hidrazin funkcióval ellátott TT-232 szintézise

5.6.2.2 Ciklizálás: a TT-232 és hidrazin-funkcionalizált TT-232 peptidek előállítása diszulfid-híd kialakításával

A peptidek két szabad tiolcsoporttal rendelkező ciszteint tartalmaznak a 2-es és a 6-os pozícióban, amelyek enyhén lúgos közegben (0,1 M Tris puffer, pH=8,1) a levegő oxigénjének hatására diszulfid-hidat alakítanak ki, így alakítva ki az ötagú gyűrűt. A 6.7.1. pontban leírt protokoll alapján végeztem a ciklizálási reakciót. A kapott nyerstermékeket RP-HPLC-s módszerrel tisztítottam, majd analizáltam (25. táblázat, 40. ábra, Függelék: F46.-F47. ábra).

5.6.2.3 Konjugálás: hidrazon-kötés kialakítása: Dau=N-NH-CO-(CH)₂-CO-TT-232 előállítása

A hidrazon-kötés kialakításához ugyanazon körülményeket alkalmaztam, mint az oxim-kötés kialakításához, 0,2 M-os NH₄OAc (pH=5,0) pufferben végeztem a reakciót. A reakció lejátszódása után (16 óra) a reakcióelegyet méretkizárásos oszlopkromatográfiás módszerrel tisztítottam 0,2 M-os NH₄OAc puffert alkalmazva eluensként. Az összegyűjtött frakciókat liofilizáltam és analizáltam (27. táblázat).

27. táblázat: A TT-232 származékok analitikai jellemzése

Vegyület	^a RP-HPLC R _f [perc]	^b ESI-MS MW _{számolt} / MW _{mért}	Termelés % főtermék
H-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Cys-Thr-NH ₂	14,6	949,4 / 949,2	85%
H-D-Phe-c[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Cys]-Thr-NH ₂	13,5	947,1 / 946,5	54%
NH ₂ -NH-CO-(CH) ₂ -CO-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Cys-Thr-NH ₂	14,8	1063,4 / 1062,5	79%
NH ₂ -NH-CO-(CH) ₂ -CO-D-Phe-c[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Cys]-Thr-NH ₂	14,2	1060,5 / 1060,4	60%
Dau=N-NH-CO-(CH) ₂ -CO-D-Phe-c[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Cys]-Thr-NH ₂ (17)	15,0	1572,6 / 1571,8	35%

^aKnauer HPLC rendszer; oszlop: Phenomenex Luna, C18, 5μm, 100Å; 250x4,6 mm; λ=220nm; áramlási sebesség: 1 ml/perc, gradiens: 0-5 perc: 0% B; 25 perc: 90% B; Eluensek: A: 0,1% TFA /víz; B: 0,1% TFA/80% acetonitril-20% víz, illetve TFA mentes, detektálás: λ=220 nm.

^bBruker Daltonics Esquire 3000+ ioncsapdás tömegspektrométer (Bremen, Germany) (spektrumok felvétele 50–2000 m/z tartományban)

Az analitikai kromatográfiás módszerhez a konjugátum savlabilitása miatt TFA mentes eluenseket alkalmaztam. A tömegspektrometriai vizsgálat során a konjugátum bomlásának elkerülése végett szintén savmentes eluenst, továbbá a kapilláris feszültség csökkentését alkalmaztam. A konjugátum azonban az alacsonyabb feszültség mellett is hasadt, a spektrumban a termék mellett a kiindulási vegyületek is megtalálhatók voltak (Függelék F48. ábra).

5.6.3 Az oxim-kötésű daunorubicin-TT-232 származékok előállítása (Dau=Aoa-D-Phe-c[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Cys]-Thr-NH₂, Dau=Aoa-Leu-Arg-Arg-Tyr-D-Phe-c[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Cys]-Thr-NH₂, Dau=Aoa-Tyr-Arg-Arg-Leu-D-Phe-c[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Cys]-Thr-NH₂)

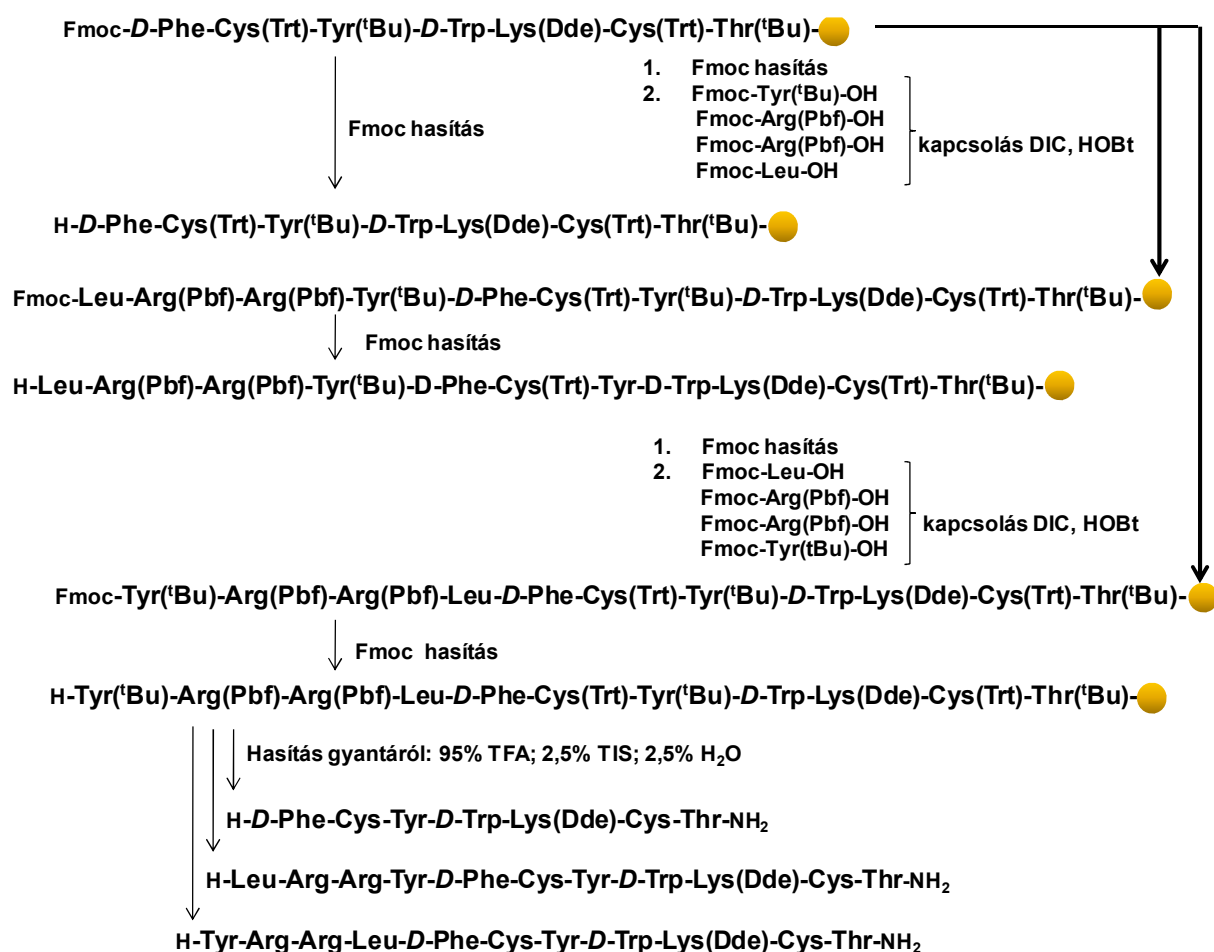
Az oxim-kötést tartalmazó TT-232 konjugátumokból három különböző vegyületet állítottam elő. Az első vegyület esetén az aminooxiacetil-csoport közvetlenül a TT-232 N-terminálisához kapcsolódik, míg a másik két esetben az aminooxiacetil-csoport és a peptid közé egy katepszin B enzimre érzékeny távtartó egység (LRRY, YRRL) is beéptésre került. Azért nem a korábbiakban alkalmazott GFLG szekvencia mellett döntöttem, mert az amúgy is

rendkívül rosszul oldódó TT-232 származék oldékonyságát tovább rontotta volna. A peptid szekvenciák kiválasztása során a specifitás fokozása (a katepszin B enzim túltermelődik a tumorsejtekben) mellett a peptidek vízóldékonyságának növelése is szempont volt. Korábbi kísérletekben ezt lipoaminosavak és liposzacharidok beépítésével próbálták megvalósítani. A módosításokkal fokozott stabilitású és biohasznosíthatóságú vegyületekhez jutottak.¹⁹¹

5.6.3.1 Az N-terminálisán aminooxiacetyl-csoporttal módosított TT-232 származékok előállítása (Aoa-*D*-Phe-c[Cys-Tyr-*D*-Trp-Lys-Cys]-Thr-NH₂, Aoa-Leu-Arg-Arg-Tyr-*D*-Phe-c[Cys-Tyr-*D*-Trp-Lys-Cys]-Thr-NH₂, Aoa-Tyr-Arg-Arg-Leu-*D*-Phe-c[Cys-Tyr-*D*-Trp-Lys-Cys]-Thr-NH₂)

A szintézisek során felhasználtam a Dau=Aoa-RC-121 előállításánál tapasztaltakat.

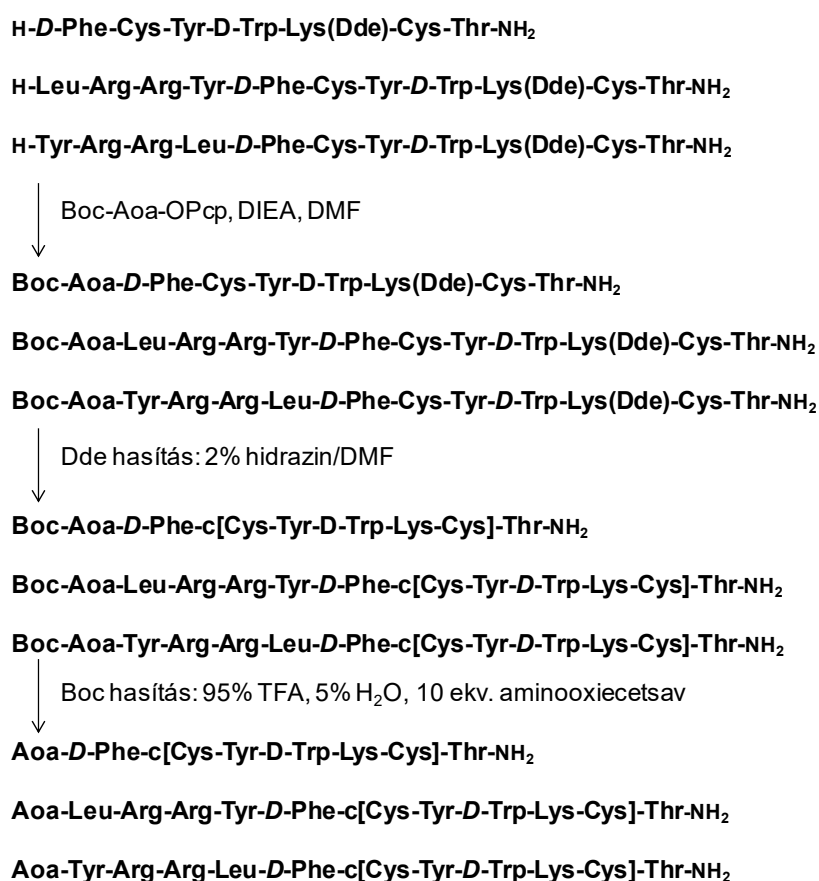
Első lépésben szilárd hordozón a lineáris aminooxiacetyl-csoportot nem tartalmazó TT-232 analógokat állítottam elő manuálisan Fmoc/^tBu stratégiával Rink-Amid MBHA gyantán, ahogyan azt a 41. ábrán és a 6.8.3.1. pontban összefoglaltam.



41. ábra: Az oxim-kötésű konjugátumokhoz szükséges lineáris prekursor peptidek előállításának sematikus ábrája

A heptapeptid alaplánc felépítése után a gyantát három részre osztottam. Az első egyharmadról lehasítottam az Fmoc-csoportot (H-*D*-Phe-Cys(Trt)-Tyr-*D*-Trp-Lys(Dde)-Cys(Trt)-Thr-gyanta). A második és a harmadik gyanta részleten továbbfolytattam a szintézist. Leu-Arg-Arg-Tyr illetve Tyr-Arg-Arg-Leu katepszin B enzimre érzékeny szekvenciáknak megfelelő védett peptid szakaszt építettem, majd lehasítottam az Fmoc-csoportot. Az YRRL és az LRRY szekvenciák választására az adott okot a korábban alkalmazott GFLG szekvenciával szemben, hogy az előbbiek hidrofil jellegűek. Így alkalmazásuk előnyösebb a rendkívül hidrofób TT-232 peptid módosításához.

Ezután mindhárom peptidet lehasítottam a gyantáról. A hasítás körülményei között a Dde védőcsoport a lizin oldalláncán maradt. A peptideket RP-HPLC-vel tisztítottam, a kapott frakciókat liofilizáltam és analizáltam (28. táblázat, Függelék **F50.-F51. ábra**). Második lépésként a tisztított lineáris peptidekhez oldatban Boc-aminooxiecetsav pentaklórfenilészterét (Boc-Aoa-OPcp) kapcsoltam a peptidek N-terminálisára (42. ábra).¹⁶⁰



42. ábra: Aminooxiacetilezett TT-232 származékok szintézisének sematikus ábrája

A reakcióelegy bepárlását követően, RP-HPLC-s tisztítást alkalmaztam, majd a kapott frakciókat analizáltam (28. táblázat, Függelék **F52.-F54. ábra**). A következő lépésben a Dde védőcsoportot hasítottam le. A hasítási reakció során a peptidek ciklizációja is végbement (30.

táblázat, Függelék: **F55.-F57. ábra**). Végül a tisztítást követően a Boc védőcsoportot eltávolítottam a peptidekről trifluorecetsavval a megfelelő „gyökfogók” és karbonil-csoport megkötő reagens mellett.

A peptideket tisztítás után liofilizálás nélkül használtam fel a konjugálási reakcióban az aminooxiacetil-csoport érzékenysége miatt (28. táblázat, Függelék **F58.-F60. ábra**). A katepszin B enzim érzékeny szekvenciát nem tartalmazó peptid tisztítása során a peptid oldószere a rossz oldékonysága miatt dimetil-formamid volt, ezért csak jelentős veszteség árán sikerült a termékeket tiszta formában izolálni.

28. táblázat: TT-232 származékok analitikai jellemzése

Vegyület	^a RP-HPLC R _t [perc]	^b ESI-MS MW _{számolt} / MW _{mért}	Termelés % főtermék
H-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys(Dde)-Cys-Thr-NH ₂	17,6	1113,5 / 1112,5	88%
Boc-Aoa-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys(Dde)-Cys-Thr-NH ₂	20,7	1286,5 / 1285,5	52%
Boc-Aoa-D-Phe-c[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Cys]-Thr-NH ₂	16,6	1120,4 / 1119,5	60%
Aoa-D-Phe-c[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Cys]-Thr-NH ₂	16,2	1020,4 / 1019,8	n.a.
H-Leu-Arg-Arg-Tyr-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys(Dde)-Cys-Thr-NH ₂	17,6	1702,0 / 1702,1	80%
Boc-Aoa-Leu-Arg-Arg-Tyr-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys(Dde)-Cys-Thr-NH ₂	19,2	1874,0 / 1874,7	58%
Boc-Aoa-Leu-Arg-Arg-Tyr-D-Phe-c[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Cys]-Thr-NH ₂	16,9	1708,0 / 1707,9	60%
Aoa-Leu-Arg-Arg-Tyr-D-Phe-c[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Cys]-Thr-NH ₂	14,8	1608,0 / 1608,7	n.a.
H-Tyr-Arg-Arg-Leu-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys(Dde)-Cys-Thr-NH ₂	17,8	1702,0 / 1701,6	85%
Boc-Aoa-Tyr-Arg-Arg-Leu-D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Lys(Dde)-Cys-Thr-NH ₂	19,2	1874,0 / 1874,3	56%
Boc-Aoa-Tyr-Arg-Arg-Leu-D-Phe-c[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Cys]-Thr-NH ₂	16,9	1708,0 / 1708,8	58%
Aoa-Tyr-Arg-Arg-Leu-D-Phe-c[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Cys]-Thr-NH ₂	14,8	1608,0 / 1608,6	n.a.

^aKnauer HPLC rendszer, oszlop: Phenomenex Luna C18, 5 µm, 100 Å, 250 mm x 4,6 mm; áramlási sebesség: 1 ml/perc; gradiens: 0-5 perc: 0% B; 25 perc: 90 % B; Eluensek: A: 0,1% TFA/víz; B: 0,1% TFA/80% acetonitril-20% víz, detektálás: λ=220 nm.

^bBruker Daltonics Esquire 3000+ ioncsapdás tömegspektrométer (Bremen, Germany) (spektrumok felvétele 50–2000 m/z tartományban)

5.6.3.2 Konjugálás: oxim-kötés kialakítása: Dau=Aoa-TT-232, Dau=Aoa-YRRL-TT-232, Dau=Aoa-LRRY-TT-232 előállítás

Az oxim-kötésű vegyületek kialakításához a korábbiakban alkalmazott körülmények között végeztem el a reakciókat, 0,2 M-os (pH=5,0) ammónium-acetát pufferben, szobahőmérsékleten. A reakcióidő lejárta után az elegyeket RP-HPLC-vel tisztítottam, majd a kapott frakciókat liofilizálás után analizáltam. Az analízisek eredményeit a 29. táblázatban foglaltam össze, valamint a Függelékben ábrázoltam (**F61.-F63. ábra**).

29. táblázat: Dau-oxim-TT-232 konjugátumok analitikai jellemzése

Vegyület	^a RP-HPLC R _t [perc]	^b ESI-MS MW _{számolt} / MW _{mért}
Dau=Aoa-D-Phe-c[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Cys]-Thr-NH ₂ (18)	17,2	1529,5 / 1528,4
Dau=Aoa-Leu-Arg-Arg-Tyr-D-Phe-c[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Cys]-Thr-NH ₂ (19)	16,2	2118,9 / 2118,6
Dau=Aoa-Tyr-Arg-Arg-Leu-D-Phe-c[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Cys]-Thr-NH ₂ (20)	16,5	2118,9 / 2118,1

^a KNAUER HPLC rendszer, oszlop: Phenomenex Luna C18, 5 µm, 100 Å, 250 mm x 4,6 mm; áramlási sebesség: 1 ml/perc; gradiens: 0-5 perc: 0% B; 25 perc: 90 % B; Eluensek: A: 0,1% TFA/víz; B: 0,1% TFA/80% acetonitril-20% víz, detektálás: λ=220 nm.

^b Bruker Daltonics Esquire 3000+ ioncsapdás tömegspektrométer (Bremen, Germany) (spektrumok felvétele 50–2000 m/z tartományban)

5.6.4 A TT-232 származékok *in vitro* citosztatikus hatásának meghatározása

A TT-232 irányító molekulát tartalmazó konjugátumok *in vitro* citosztatikus hatását HT-29 sejteken vizsgáltam MTT módszerrel. A kapott eredményeket összehasonlítottam a referencia TT-232 peptid hatásával. Az irodalomban található adatok^{85,87,191,192,193} alapján a TT-232 peptiddel a különböző *in vitro* tesztek során (MTT, XTT (2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-szulfófenil)-2H-tetrazólium-5-karboxanilid)) 8-24, illetve 48 órás kezeléseket végeztek. Ez alapján én a 24 órás kezelési időt választottam az MTT-tesztekhez. Az eredményeket a 30. táblázatban foglaltam össze.

30. táblázat: TT-232 és hatóanyag tartalmú származékainak IC₅₀ értékének meghatározása MTT-teszt segítségével HT-29 sejteken

Konjugátum	IC ₅₀ (µM) HT-29
TT-232	22,1 ± 0,20
Dau=hidrazon-TT-232 (17)	2,6 ± 0,99
Dau=Aoa-TT-232 (18)	2,1 ± 0,90
Dau=Aoa-LRRY-TT-232 (19)	0,6 ± 0,04
Dau=Aoa-YRRL-TT-232 (20)	3,2 ± 0,41
Dau.HCl	0,1 ± 0,00

Mind a négy konjugátum esetében jelentős sejtosztódást gátló hatást eredményezett a daunorubicin konjugációja a TT-232 molekulához. A vizsgált kötéstípusok mindegyike hasonló hatást eredményezett, amely arra enged következtetni, hogy a hidrazon- és az oxim-kötés egyaránt alkalmazható. Az LRRY enzimlabilis távtartó beépítése jelentősen növelte a konjugátum proliferációgátló hatását, míg a fordított szekvencia (YRRL) nem változtatta meg az eredeti konjugátum citosztatikus aktivitását. Az N-terminálison történt módosítás nem befolyásolta a vegyület tumorelleses aktivitását. A legnagyobb mértékben a Dau=Aoa-

LRRY-TT-232 (**19**) gátolta a tumorsejtek osztódását, továbbá ez a vegyület közelítette meg leginkább a daunorubicin hatását is.

5.7 Különböző célbajuttatóegységet tartalmazó konjugátumok alkalmazása kombinációs kezelésekben

Doktori kutatásaim során mindvégig az volt a célom, hogy minél hatékonyabb tumorellenes hatású, mellékhatásoktól mentes vegyületeket állítsak elő. De, ahogyan azt már az 5.2-es fejezetben írtam, az irányított tumorterápiának vannak korlátai a sejteken található, célbavehető receptorok limitált számának köszönhetően. Erre a problémára lehet megoldás a kombinált terápia is, amelynek során a kezelés különböző irányító molekulákat tartalmazó konjugátumok adagolásával történik. Így elérhetjük, hogy azok különböző támadási pontokon hatva egymás hatását felerősítsék. Az előző fejezetekben bemutatott daunorubicin hatóanyag tartalmú GnRH-III illetve szomatosztatin konjugátumokat terveztem kipróbálni kombinációs kísérletekben.

5.7.1 Kombinációs vizsgálatok GnRH és szomatosztatin konjugátumokkal

A kombinációs kísérletekhez az önmagukban leghatékonyabb hatást mutató vegyületeket jelöltem ki. A GnRH-III-daunorubicin konjugátumok közül a 4-es helyzetben vajsavval acilezett, 8-as helyzetben oxim-kötésben daunorubicint tartalmazó biokonjugátumot, a GnRH-III(⁴Lys(nBu), ⁸Lys(Dau=Aoa))-t (**3**), a szomatosztatin konjugátumok közül Dau=Aoa-LRRY-TT-232-t (**19**) választottam. A kombinációs kísérletekben a kezeléseket különféle konstrukciókban hajtottam végre, amelyeket a 31. táblázatban foglaltam össze. A tesztekben a vegyületek össz (a két konjugátumból származó) daunorubicin tartalomára számított legmagasabb koncentrációja 100 µM volt.

31. táblázat: Kombinációs MTT-tesztek TT-232 és GnRH-III származékokkal

Konjugátum	Kezelési idő és sorrend
a , GnRH-III(⁴ Lys(nBu), ⁸ Lys(Dau=Aoa) (3) (I) + Dau=Aoa-LRRY-TT-232 (19) (II)	6 óra I + II keverékével egyszerre
b , GnRH-III(⁴ Lys(nBu), ⁸ Lys(Dau=Aoa) (3) (I) + Dau=Aoa-LRRY-TT-232 (19) (II)	24 óra I + II keverékével egyszerre
c , GnRH-III(⁴ Lys(nBu), ⁸ Lys(Dau=Aoa) (3) (I) + Dau=Aoa-LRRY-TT-232 (19) (II)	I: 6 óra majd ezután II: 24 óra
d , GnRH-III(⁴ Lys(nBu), ⁸ Lys(Dau=Aoa) (3) (I) + Dau=Aoa-LRRY-TT-232 (19) (II)	II: 24 óra, majd I: 6 óra

Az első esetben a két vegyülettel egyszerre 6 órán át kezeltem. A második kísérletben ugyancsak a kettő keverékével történt a kezelés 24 órán át. A harmadik esetben először a

GnRH-III konjugátummal kezeltem 6 órás kezelési idővel, majd a **19**-es vegyülettel 24 órán át. A negyedik kezelési mód esetén először történt 24 órás kezelés a TT-232 konjugátummal, majd a GnRH-III konjugátummal 6 órán át. Minden vizsgálat esetén a kezelést követően a sejteket további 72 órán át kultúrában tartottam, majd meghatároztam a citosztázis értéküket. Az alkalmazott beméréseket minden esetben a daunorubicin tartalomra számoltam ki, így a kapott IC₅₀ értékek, amelyeket a 32. táblázatban foglaltam össze a daunorubicin tartalomra vonatkoznak.

32. táblázat: TT-232 származékokkal végzett kombinációs MTT-tesztek eredményei

Konjugátum	IC ₅₀ (μM) HT-29
a , I + II keveréke, 6 órás kezelés	1,7 ±0,25
b , I + II keveréke 24 órás kezelés	0,8 ±0,44
c , I: 6 óra majd ezután II: 24 órás kezelés	1,2 ±0,41
d , II: 24 órás kezelés, majd I: 6 órás kezelés	0,8 ±0,32
GnRH-III(⁴ Lys(nBu), ⁸ Lys(Dau=Aoa) (3) 24 órás kezelés	13,7 ±0,17
GnRH-III(⁴ Lys(nBu), ⁸ Lys(Dau=Aoa) (3) 6 órás kezelés	2,2 ±0,60
Dau=Aoa-LRRY-TT-232 (19) 24 órás kezelés	0,6 ±0,04
Dau=Aoa-LRRY-TT-232 (19) 6 órás kezelés	3,0 ±0,70
daunorubicin: 6 órás kezelés	0,1 ±0,00

A 31. táblázatban összefoglalt terv szerint elvégzett kombinált kezelések eredményei alapján arra a következtetésre jutottam, hogy a TT-232 konjugátumoknak valóban hosszabb időre van szükségük, a megfelelő hatás kifejtése érdekében, mivel mind a **19**-os konjugátum önmagában, mind a keverék 6 órás kezelést alkalmazva egy nagyságrenddel rosszabb hatású volt, mint a Dau=Aoa-LRRY-TT-232 (**19**) 24 órás kezelés esetén. A TT-232 konjugátum sejtsztódást gátló hatását egyik konstrukcióval sem sikerült felülmúlni, bár minden esetben jobb hatást értem el, mint a GnRH-III vegyület antiproliferatív hatása mind 6 órás, mind 24 órás kezelési idő esetén. Jobb hatást valószínűleg akkor tapasztalnánk, ha különböző hatóanyagokat tartalmaznának a konjugátumok.

6 Kísérleti rész

6.1 A szintézisekhez alkalmazott reagensek

- aminosav származékok, Fmoc-O₂Oc-OH, Rink Amid MBHA gyanta (IRIS Biotech GmbH, Marktreidwitz, Németország vagy Reanal, Budapest, Magyarország)
- Rink-Amid ChemMatrix gyanta (PCAS BioMatrix Inc., Quebec, Kanada)
- DCM, DMF, etanol, dietil-éter (Molar Chemicals, Budapest, Magyarország)
- piperidin, TFA, DIC, HBTU, DIEA, TIS, DMSO, DBU, HOBt, 11-azido-3,6,9-trioxaundekán-1-amin, TBTA, zsírsavak és zsírsav származékok, TFE, oktanol, kurkumin, Boc-Aoa-OH, Boc₂-Aoa-OH, aminooxiecetsav (Sigma-Aldrich Kft, Budapest, Magyarország)
- HPLC minőségű acetonitril, metanol (Merck Kft, Budapest, Magyarország).
- Daunorubicin hidroklorid (IVAX, Budapest, Magyarország ajándéka).

6.2 Általános eljárások

A fejezetben a szintézisek, a kémiai és biológiai vizsgálatok protokolljait írom le. Ha az alkalmazott protokoll az alább leírtaktól különbözött, akkor arra az egyes esetekben külön kitérek.

6.2.1 A manuális szintéziseknél alkalmazott Fmoc/^tBu stratégia protokollja

1.	gyanta duzzasztása DMF-dal, 3 × 0,5-1 perc
2.	átmeneti Fmoc-védőcsoport hasítása 2% piperidin, 2% DBU/DMF tf% eleggyel 4-szer (2 + 2 + 5 + 10 perc)
3.	gyanta mosása DMF-dal, 8 × 0,5-1 perc
4.	kapcsolás: Fmoc-aminosavszármazék : DIC : HOBt / DMF= 3:3:3 (gyantakapacitásra számolva), 60 perc
5.	gyanta mosása DMF-dal 3 × 0,5-1 perc, DCM-nal, 4 × 0,5-1 perc
6.	Kaiser teszt: <ul style="list-style-type: none">• ha a teszt pozitív (kék), 2 × DMF-dal mossuk a gyantát és friss reagensekkel megismételjük a kapcsolást• ha a teszt negatív (sárga), azaz a kapcsolás teljes mértékben végbement, a ciklust előlről kezdjük

6.2.2 Az automata szintetizátorral (Prelude Peptide Synthesizer) végzett szintéziseknél alkalmazott Fmoc/^tBu stratégia protokollja

1.	gyanta mosása DMF-dal, 3 × 1 perc
2.	átmeneti Fmoc-védőcsoportot hasítása 20% piperidin/DMF t ^o % eleggyel, 2 × 2,5 perc
3.	gyanta mosása DMF-dal, 6 × 0,5 perc
4.	kapcsolás: Fmoc-aminosavszármazék: HBTU: DIEA / DMF = 3:3:6 (gyantakapacitásra számolva), 1 × 60 perc
5.	gyanta mosása DMF-dal, 2 × 1 perc

6.2.3 Kaiser-teszt: ninhidrin- és izatin- teszt

A szilárdfázisú peptidszintézis során a kapcsolás végbemenetelét ninhidrin (Kaiser)-teszttel, prolinhoz történő kapcsolás esetén izatin teszttel vizsgáltam.

A tesztekhez szükséges oldatok készítése:

A oldat: 2,5 g ninhidrint 50 ml absz. etanolban oldunk

B oldat: 40 g fenolt 10 ml absz. etanolban oldunk

C oldat: 0,01M-os KCN oldatot hígítunk 98 ml piridinnel

D oldat: 0,4 g izatint 12 ml benzilalkoholban oldunk, majd 2 óra kevertetés után leszűrjük és a szűrlet minden mililiteréhez adunk 50 mg Boc-Phe-OH-t.

A ninhidrin-teszt kivitelezése: A kapcsolási reakciót követő mosások után néhány szem gyantát kis kémcsőbe helyezünk, majd az A, B, C oldatokból három-három cseppet adunk. Ekkor az oldat elegy sárga színű. A kis kémcsövet 104°C-ra melegítjük. Ezen a hőmérsékleten tartjuk 5 percig, majd ellenőrizzük az oldat és a gyantaszemcsék színét. Amennyiben a gyanta és az oldat kék színű (pozitív eredmény), a kapcsolási reakciót meg kell ismételni, ugyanis még szabad aminos csoportok vannak jelen a gyantaszemcséken. Viszont, ha sárga színű (negatív eredmény), az a szabad aminos csoportok hiányát jelzi, a kapcsolás tehát teljes mértékben sikeres volt.

Az izatin-teszt kivitelezése: hasonlóan végezzük el, mint az előző tesztet, azzal a különbséggel, hogy mind a négy oldatból (D, A, B, C sorrendben) három-három cseppet adunk a gyantaszemcsékhez. Így narancs színű oldat elegy keveréket kapunk. Öt percig 104°C-on tartjuk a kis kémcsövet, majd ellenőrizzük a színét. Ha a gyanta barnás-fekete elszíneződést mutat (pozitív eredmény), akkor az a szabad iminocsoportok jelenlétére utal, a kapcsolást meg kell ismételni. Ha mind a gyanta, mind az oldat színe változatlan marad (negatív eredmény) a kapcsolás teljes mértékben lezajszódott.

6.2.4 A peptidek és konjugátumok analízise

6.2.4.1 Analitikai RP-HPLC módszere

A peptidek tisztaságának ellenőrzésére analitikai RP-HPLC-t használtam (KNAUER GmbH, Hamburg, Németország), kétféle oszlopot alkalmazva:

- Phenomenex Jupiter (Torrence, CA, USA); C18; 250 x 4,6 mm; 5 μ m szilika; 300 Å töltetű oszlop
- Phenomenex Luna (Torrence, CA, USA); C18; 250 x 4,6 mm; 5 μ m szilika; 100 Å töltetű oszlop

Az elválasztáshoz lineáris gradiens elúciót alkalmaztam (0% B – 90% B, 50 perc vagy 0% B – 90% B, 25 perc: az adott vegyületek eredményeit tartalmazó táblázatoknál feltüntettem).

Az oszlop ekvibrálásához és az elúcióhoz alkalmazott elegyek a következők voltak:

A eluens: 0,1% TFA/víz, illetve a hidrazon kötésű TT-232 konjugátum esetén savlabilitása miatt, az eluens TFA mentes változata

B eluens: 0,1% TFA/acetonitril-víz (80:20 t%), illetve a hidrazon kötésű TT-232 konjugátum esetén savlabilitása miatt, az eluens TFA mentes változata

A megtisztított vegyületeket A eluensben, vagy desztillált vízben oldottam (koncentráció: 0,5-1,0 mg/ml). Az oldatokból 20 μ l-t injektáltam az oszlopra. A mérések során a kromatográfiás oszlop nem termosztált környezetben volt, az elválasztásokat szobahőmérsékleten végeztem. A folyási sebesség 1 ml/perc volt. A detektálás abszorbancia mérésével (λ =220 nm) történt.

6.2.4.2 Tömegspektrometriás vizsgálat

A tömegspektrometriás mérésekhez elektropray ionizációs (ESI-MS) Bruker Daltonics Esquire 3000+ típusú készüléket használtam (Bruker-Daltonics, Bréma, Németország).

Az előállított molekulák azonosítására a termékeket 0,01% ecetsavat tartalmazó 50% acetonitril-víz elegyében oldottuk fel. A spektrumokat folyamatos mintaadágalás mellett (4 μ l/perc sebességgel) 50-2000 m/z tartományban, pozitív üzemmódban vettem fel.

Az enzimes vizsgálatokat LC-MS csatolt technikával hajtottam végre. A tömegspektrométer készülékhez diódasoros detektorral ellátott Agilent 1100 típusú HPLC rendszert kapcsolunk. A peptideket, metabolizmus termékeket Vydac MS C18 oszlopon (150 mm x 1 mm; 300 Å; 3 μ m; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) választottam el lineáris gradiens elúciót alkalmazva (kezdeti összetétel: 90% A eluens (0,1% hangyasav

vízben tf%, és 10% B eluens (0,1% hangyasav acetonitrilben tf%), amely 60 perc alatt emelkedik 70% B eluensre) 50 µl/perc folyási sebességgel. A spektrumokat 100-2500 *m/z* tartományban, pozitív üzemmódban vettem fel.

6.2.5 Preparatív tisztítás

A nyers peptidek, hatóanyag származékok és konjugátumok tisztításához félpreparatív illetve preparatív rendszert alkalmaztam:

- félpreparatív RP-HPLC (KNAUER GmbH, Hamburg, Németország): Az oszlopon (Phenomenex Luna; C18; 10 µm; 100 Å; 250x10mm) gradiens elúciót alkalmaztam. Az elúciós program az adott peptidtől, vegyülettől, konjugátumtól függött. A minta oldószere (A és B eluens elegye, DMF) illetve az injektált oldat koncentrációja a minta oldékonyságától, tisztaságától, a minta komponensek elválaszthatóságától függött. A mintákból az oszlopra 2 ml mennyiségeket injektáltam. Az elválasztásokat szobahőmérsékleten végeztem, a folyási sebesség 4 ml/perc volt. A detektálás abszorbancia mérésével ($\lambda=220$ illetve 280 nm) történt.

- preparatív RP-HPLC (KNAUER GmbH., Hamburg, Németország): Az oszlopon (Phenomenex Luna; C18; 100 Å; 10µm; 250 x 21,2mm; Phenomenex Jupiter C4; 300 Å; 10µm; 250 x 21,2mm) vegyülettől függő elúciós programmal lineáris gradiens elúciót alkalmaztam. A minta oldószere (A és B eluens elegye, DMF) illetve az injektált oldat koncentrációját ugyancsak a minta oldékonysága határozta meg. A preparatív oszlopok akár 25 mg/ml koncentrációjú oldat tisztítását is lehetővé teszik. A mintákból az oszlopra 2 ml mennyiségeket injektáltam. Az elválasztásokat szobahőmérsékleten végeztem, a folyási sebesség 9,5 ml/perc volt. A detektálás abszorbancia mérésével ($\lambda=220$ illetve 280 nm) történt.

6.3 Négyes helyzetben zsírsav láncokkal módosított daunorubicin-GnRH-III biokonjugátumok előállítása, kémiai és biológiai vizsgálata

6.3.1 A GnRH-III(⁴Lys(X), ⁸Lys(Dau=Aoa)) konjugátumok előállítása

6.3.1.1 A GnRH-III(⁴Lys(X), ⁸Lys(Aoa)) peptidek szintézise

A 4-es helyzetben különböző lánchosszúságú zsírsavakkal (propionil=Pr, butiril=nBu, izobutiril=iBu, krotonil=CA, izovaleril=iVA, hexanoil=Hex, miriszoil=Myr) acilezett lizint tartalmazó, a 8-as helyzetben aminooxiecetsavval módosított GnRH-III származékokat manuálisan 0,64 mmol/g kapacitású 2000 mg tömegű Fmoc-Rink Amid MBHA gyantán végeztem Fmoc/^tBu stratégiával a 6.2.1. pontban leírt protokoll alapján (17. ábra) a következő aminosav származékokat felhasználva: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Lys(Mtt)-OH, Fmoc-Trp-OH, Fmoc-Asp(O^tBu)-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Lys(ivDde)-OH, Glp.

Az alaplánc felépítése után lehasítottam a 4-es pozícióban lévő lizin ε-aminocsoportjáról az ivDde védőcsoportot 2% hidrazin/DMF elegyével (6×5 perc), majd a gyantát 7 részre osztottam. A 4-es helyzetű lizin szabaddá vált ε-aminocsoportját a különböző zsírsavláncokkal acileztem 33. táblázatban összefoglalt körülmények között. A zsírsavszármazékokból is a gyantakapacitásra számolva 3 ekvivalenst alkalmaztam. Az acilezési reakciók sikerességét szintén Kaiser-tesztel ellenőriztem.

33. táblázat: Acilezési reakciók

Peptid	zsírsav származék	kapcsolási reagens
GnRH-III(⁴ Lys(Pr), ⁸ Lys(Aoa))	propionsav-anhidrid	DIEA
GnRH-III(⁴ Lys(iBu), ⁸ Lys(Aoa))	izovajsav-anhidrid	DIEA
GnRH-III(⁴ Lys(nBu), ⁸ Lys(Aoa))	vajsav-anhidrid	DIEA
GnRH-III(⁴ Lys(CA), ⁸ Lys(Aoa))	krotonsav-klorid	DIEA
GnRH-III(⁴ Lys(iVA), ⁸ Lys(Aoa))	izovaleriánsav-anhidrid	DIEA
GnRH-III(⁴ Lys(Hex), ⁸ Lys(Aoa))	hexánsav	DIC, HOBt
GnRH-III(⁴ Lys(My), ⁸ Lys(Aoa))	mirisztinsav	DIC, HOBt

A sikeres acilezési reakciók után a 8-as helyzetű lizinen lévő Mtt védőcsoportot hasítottam le 2% TFA, 2% TIS / DCM hasítóeleggyel, mellyel néhány perces reakcióidővel a gyantát addig mostam, míg állandó, intenzív sárga színt nem kapott. Majd ezt addig folytattam, amíg a hasítóelegy el nem színtelenedett. A savas hasítás után semlegesítési lépés következett, amelyhez 10% DIEA/DCM elegyét használtam, majd a gyantát diklórmétánnal mostam. A hasítás sikerességét Kaiser-tesztel ellenőriztem. Ezt követően Boc-Aoa-OH-t kapcsoltam DIC/HOBt kapcsolóreagensek segítségével (3-3 ekvivalens). Ezután a gyantákat absz. etanollal mostam és exsikkátorban szárítottam.

A kész peptideket a gyantáról 95% TFA, 2,5% H₂O, 2,5% TIS (tf%) hasítóeleggyel (10 ml) hasítottam. A hasítás során az említett „gyökfogókon” túl, feleslegben 10 ekvivalens szabad aminosav (karbonil-csoportot megkötő reagens) alkalmaztam, hogy elkerüljem a láncon lévő aminosavak karboxil-csoportjainak mellékreakcióit. A gyantán lévő peptideket a hasítóeleggyel 15 percen keresztül jeges hűtéssel (0°C), majd 1,5 órán át szobahőmérsékleten kevertettem. Ezután a peptideket 100 ml hideg dietil-éterbe szűrtem. A gyantát trifluoecetsavval, majd diklórmétánnal mostam. A fehér csapadékot centrifugálással ülepítettem 5 percig 4000/perc fordulaton (Eppendorf 5702, Eppendorf, Ausztria). Az üledékről az étert dekantálással eltávolítottam, majd a peptidet az előzőekhez hasonlóan hideg éterben háromszor mostam. Ezután 10%-os ecetsav oldatban feloldottam a peptideket. Az oldatokat folyékony N₂-ben lefagyasztottam, majd liofilizáltam.

A nyerstermékeket RP-HPLC-vel tisztítottam, tisztítás után a termékeket liofilizálás nélkül, az oldószer eltávolítását követően használtam fel a következő konjugálási lépésben a peptidek érzékenysége miatt. A peptidekből egy kis mintamennyiséget azonban liofilizáltam és analitikai RP-HPLC és ESI-MS módszerekkel jellemeztem (3. táblázat, Függelék: **F1-F7. ábra**).

6.3.1.2 Konjugálási reakciók: GnRH-III(⁴Lys(X), ⁸Lys(Dau=Aoa))

konjugátumok előállítása

A konjugálási reakciókat, a peptidek aminosav-csoportja és a daunorubicin 13-as C-atomján lévő karbonilcsoportja közötti oxim-kötés kialakítását 10 mg/ml-es peptid koncentrációval 0,2M NH₄OAc (pH=5,0) pufferben végeztem. A konjugálási reakció minden esetben szobahőmérsékleten, folyamatos kevertetés mellett 16 óra alatt végbement. Majd a reakcióelegyeket RP-HPLC-vel tisztítottam. A frakciókat folyékony N₂-ben fagyasztottam, liofilizáltam, és analitikai RP-HPLC és ESI-MS módszerekkel jellemeztem (4. táblázat, Függelék **F8-F14. ábra**).

6.3.2 A GnRH-III(⁴Lys(X), ⁸Lys(Dau=Aoa)) konjugátumok enzimatiszta stabilitása/degradációja

6.3.2.1 Stabilitás vizsgálatok sejtenyészti médiumban RP-HPLC segítségével

A GnRH-III(⁴Lys(X), ⁸Lys(Dau=Aoa)) biokonjugátumok stabilitását vizsgáltam sejtenyészti médiumban, annak érdekében, hogy megbizonyosodjak róla, hogy a vegyületek stabilak maradnak a biológiai vizsgálatok körülményei között.

A vegyületeket első lépésben vízben oldottam, majd az oldatokat DMEM sejttenyésztő médiummal hígítottam úgy, hogy a 0,5 mg/ml koncentrációjú oldatok végső víztartalma 20% legyen. A biokonjugátum oldatokat 37°C-on inkubáltam 6 órán keresztül. Óránként 50 µl mintát vettem. A minták stabilitásának vizsgálata RP-HPLC módszerével történt a fent leírt KNAUER rendszeren.

6.3.2.2 A GnRH-III(⁴Lys(X),⁸Lys(Dau=Aoa)) biokonjugátumok α -kimotripszin emésztő enzim jelenlétében

A GnRH-III(⁴Lys(X),⁸Lys(Dau=Aoa)) konjugátumokat α -kimotripszinnel inkubáltam 25°C-on 7,8-as pH-jú Trisz pufferben (100 mM Trisz-HCl / 10 mM CaCl₂). A biokonjugátum-enzim arány 50:1 (w/w%) volt. A reakcióelegyből 5 perc, 1, 2, 4, 6, 8 és 24 óra után mintát vettem (50 µl). A mintákban a reakciót ecetsav (5 µl) hozzáadásával állítottam le. Minden egyes mintát LC-MS módszerével megvizsgáltam a fentebb leírt körülmények között. Minden konjugátum esetében referencia vizsgálatot is végeztem enzimmentes körülmények között.

6.3.2.3 A GnRH-III(⁴Lys(X),⁸Lys(Dau=Aoa)) biokonjugátumok patkány máj lizoszóma homogenátum jelenlétében végzett lebomlási vizsgálata LC-MS módszerrel

A patkány máj lizoszóma preparátumot a kísérletekhez Dr. Orbán Erika készítette a következő protokoll alapján¹²⁵: 2 hím patkánytól származó májat gyűjtöttünk be és homogenizáltunk két részletben jéghideg szacharóz oldatban (0,3 M, 15g). A homogenátumot háromszorosára hígítottuk a szacharóz oldattal (0,3 M). A sejtmagokat és a sejt törmeléket centrifugáltuk (10 perc, 700g). A kapott felülúszót a szacharóz oldattal mostuk, majd újra centrifugáltuk (10 perc, 700g). Majd a nyers lizoszóma-mitokondrium frakció ülepítése érdekében a felülúszót centrifugáltuk (10 perc, 10000g). Az üledéket újra homogenizáltuk 20 ml CaCl₂-ot tartalmazó szacharóz oldatban (0,3 M, végső CaCl₂ koncentráció: 1 mM). A homogenátumot a mitokondriumok megduzzadása érdekében 5 percig 37°C-on inkubáltuk, majd 20 ml 50%-os Percoll oldatot (sűrűséggradiens szeparálás) adtunk az elegyhez, amit a homogenátum centrifugálása követett (10 perc, 10000g). A felülúszót eltávolítottuk, míg a pelletet újrassuszpendáltattuk a szacharóz oldatban és újra centrifugáltuk (10 perc, 10000g). A kapott kemény, barna színű pellet volt a lizoszóma frakció, amelyet 1:2 arányban hígítottunk a szacharóz oldattal a könnyebb pipetázhatóság érdekében. A homogenátum fehérje tartalmát Pierce BCA (bicinchoninic sav) fehérje esszével határoztuk meg. A gyártó által javasolt

protokoll alapján esetünkben a koncentráció 17,4 µg/µl volt.

Az emésztési vizsgálatokhoz a biokonjugátumokat nátrium-acetát pufferben (0,2 M, pH=5,0) oldottam fel. Az oldatok koncentrációja 0,1 µg/µl volt. Majd az így kapott oldatokhoz adtam a patkány máj lizoszóma homogenátumot. A konjugátum-lizoszóma homogenátum arány 1:1 (w/w%) volt. A reakció elegyeket 37°C-on inkubáltam. Az 5. percben, az 1., 2., 4., 6., 8., és 24. órában a reakcióelegyből 50 µl mintát vettem. A kivett mintákhoz minden esetben 5 µl ecetsavat adtam a reakció leállításához, majd LC-MS segítségével meghatároztam a konjugátumokból képződött metabolitokat. A vizsgálatokat enzimmentes környezetben is elvégeztem.

A GnRH-III(⁴Lys(nBu), ⁸Lys(Dau=Aoa-X-Y-Lys(Dau=Aoa-X-Y))) (ahol X= Ø vagy GFLG, Y= Ø vagy O₂Oc) biokonjugátumok patkány máj lizoszómális enzimek jelenlétében végzett lebomlását ugyanilyen módszerrel végeztem el, ezért erre a későbbiekben már nem térek ki.

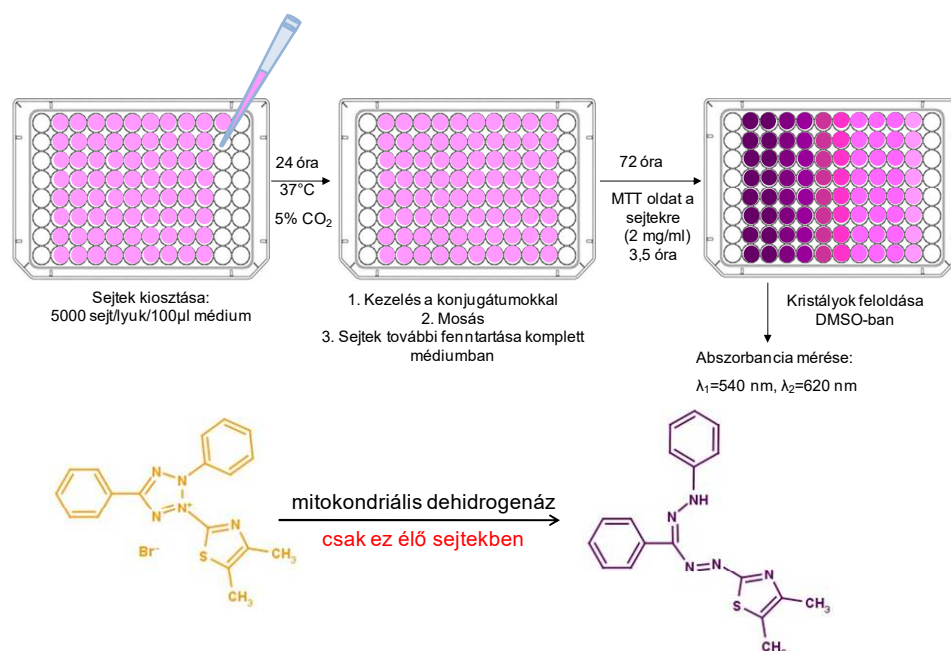
6.3.3 A GnRH-III(⁴Lys(X), ⁸Lys(Dau=Aoa)) konjugátumok *in vitro* citosztatikus hatásának vizsgálata

Az MTT-teszt a sejtek életképességének megállapítására alkalmazható módszer. Alapjául a sárga színű MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid) lila színű formazán származékká redukálódása szolgál. A mitokondriális dehidrogenáz enzim által katalizált reakció kizárólag az élő sejtekben játszódik le. A vizsgált anyag hatékonyságát úgy határozhatjuk meg, hogy a hatóanyaggal kezelt sejtekben képződött lila formazán mennyiségét összehasonlítjuk a kezeletlen kontroll sejtekben lévő formazán mennyiségével. Ebből az okozott sejthalálra tudunk következtetni.

Citosztatikusnak nevezzük azokat az anyagokat, amelyekkel történő kezelés hatására a sejtek proliferációja megváltozik. A citosztatikus hatás a vizsgált vegyületre jellemző adat az adott sejttípuson.

A konjugátumokat HT-29 humán vastagbél adenokarcinóma, MCF-7 humán emlő adenokarcinóma, HepG2 humán hepatocelluláris máj karcinóma és HL-60 humán promielocitás leukémia sejteken vizsgáltam MTT-tesztel.

A következőkben röviden összefoglalom a kísérletek elvégzésének körülményeit és lépéseit (43. ábra), amelyek ugyancsak vonatkoznak a későbbi fejezetekben bemutatott vegyületek mérése során alkalmazottakra.



43. ábra: MTT-teszt

A sejtek kultúrában tartása és növesztése 37°C-on, 5% CO₂ atmoszféra mellett, komplett RPMI 1640 médiumban (HT-29) valamint komplett DMEM médiumban (MCF-7, HL-60, HepG2) történt. A komplett médium mindkét esetben tartalmazott: 10% FCS-t (magzati borjú szérum), L-glutamint (2 µg/ml), és gentamicint (160 µg/ml) illetve a DMEM estében még nátrium-piruvátot (1 µmol/ml) és nem-esszenciális aminosavakat is.

A kísérletet megelőző napon a fentebb említett módon tartott sejteket 96 lyukú szövettenyésztő lemezre osztottuk 100 µl szérumtartalmú, komplett médiumban (5x10³ sejt/lyuk). Következő nap eltávolítottam 50 µl médiumot, majd a negatív kontroll sejtekre 150 µl szérummentes médiumot, míg a kezelt sejtekre 50 µl szérummentes médiumot és 100 µl szérummentes médiumban oldott hatóanyagot adagoltam, különböző koncentrációban (a törzsoldat vegyülettől függően 2% steril dimetil-szulfoxidot vagy 20% steril, kétszer desztillált vizet tartalmazott). A kezeléseket $c = 100 \mu\text{M} - 2,56 \times 10^{-4} \mu\text{M}$ koncentráció tartományban végeztem. A kezelési idő elteltével a sejteket 135-135 µl szérummentes médiummal mostam 2-szer, majd ezt követően lyukanként ugyanennyi teljes médiumot adtam a sejtekhez. (A kombinált kezelések esetén a mosást követően újabb kezelés következett, majd az újabb kezelési idő lejártá után újból mostam a sejteket 135-135 µl szérummentes médiummal 2-szer.) Majd további három nap (72 óra) inkubálás után 45 µl MTT-oldatot ($c = 0,345 \mu\text{M}$, szérummentes médiumban oldva, 0,22 µm szűrővel szűrve) adtam a sejtekhez lyukanként, majd a lemezeket 37°C-on, 3,5 órán át inkubáltam. Miután az inkubálási idő letelt, a sejtekről a felülúszót centrifugálással óvatosan eltávolítottam (5 perc, 4°C, 863g) és a

lila kristályokat 100 µl DMSO-ban oldottam. Az optikai denzitást ELISA Reader segítségével ($\lambda = 540, 620 \text{ nm}$) mértem. Az 540 nm-en mért optikai denzitás értékekből kivontam a 620 nm-en mértéket (kompenzált abszorbancia: háttérérték kivonása), majd a citosztázis mértékét (%) a következő képlettel határoztam meg:

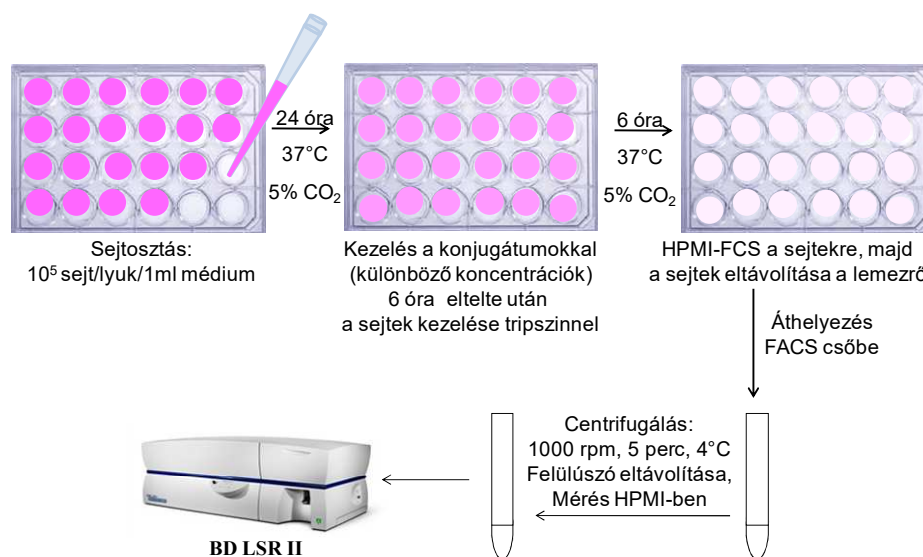
$$\text{Citosztázis (\%)} = (1 - A_{\text{kezelt}} / A_{\text{kontroll}}) \times 100,$$

ahol A_{kezelt} a kezelt sejtek, míg A_{kontroll} a kontroll sejtek esetében kompenzált abszorbanciát jelenti.

A citosztázis mértékét a koncentráció függvényében ábrázolva a kapott görbék segítségével meghatározhatók az IC_{50} értékek. Az IC_{50} érték azt a koncentrációértéket jelenti, amely a vizsgált sejt kultúrában a sejtek 50%-ának pusztulását okozza.

6.3.4 A GnRH-III($^4\text{Lys(X)}$, $^8\text{Lys(Dau=Aoa)}$) konjugátumok sejtbejutási képessége

Az előállított GnRH-III($^4\text{Lys(X)}$, $^8\text{Lys(Dau=Aoa)}$) (1-7) biokonjugátumok sejtbejutását áramlási citometria módszerével vizsgáltam MCF-7 és HT-29 sejteken (44. ábra).



44. ábra: Sejtbejutás vizsgálata áramlási citometriával

Az áramlási citometria egy olyan eljárás vagy mérési módszer, amellyel a folyadékáramban lévő önálló részecskék (például sejtek) egyedi tulajdonságait (fizikai, kémiai, biokémiai, biológia jellemzőit) tudjuk lemérni. A módszer alkalmas arra, hogy a különböző sejtpopulációkat a mért paramétereik alapján megkülönböztessük (FACS=fluorescence-Activated Cell Sorting).¹⁹⁴

A kísérlet első lépéseként a sejteket 24 lyukú sejtenyésző lemezre osztottuk 1 ml szérumtartalmú, komplett médiumban (10^5 sejt/lyuk). Ezt követően 37°C-on inkubáltuk a

sejteket 24 órán át, majd 5 percig 1000 rpm fordulatszámon centrifugáltuk azokat és eltávolítottuk róluk a felülúszót. Az inkubálást követően a sejteket 250 µl szérummentes médiumban (RPMI-1640, vagy DMEM) oldott különböző koncentrációjú (0,16 µM-100 µM) oldatokkal kezeltük 6 órán át 37°C-on. Kontrollként szérummentes médiummal kezelt sejteket alkalmaztunk. A 6 óra elteltével a sejtekről eltávolítottuk az oldatokat, majd 10 percen keresztül 37°C-on 100 µl koncentrációjú tripszin oldattal inkubáltuk annak érdekében, hogy a sejtfelszínen aspecifikus kötődést lehetővé tevő sejtfelszíni struktúrákat eltávolítsuk. A tripszinezést lyukanként 700 µl 10% magzati borjúsérumot tartalmazó HPMI oldattal (glükóz, NaHCO₃, NaCl, HEPES, KCl, MgCl₂, CaCl₂, Na₂HPO₄ x 2H₂O) állítottuk le és a sejteket a lemezről FACS csövekbe helyeztük. HPMI-vel való mosást követően a sejteket 500 µl HPMI-ben szuszpendáltattuk fel. A kezelést és mintaelőkészítési lépéseket követően az MCF-7 és HT-29 sejtek fluoreszcencia intenzitásának, ezáltal a jelölt peptidek sejtbefutási képességének meghatározását áramlási citometriával határoztuk meg (BD LSR II, BD Bioscience, San Jose, CA). Az adatokat FACSDiVa software segítségével dolgoztuk fel (19.-20. ábra).

6.3.5 A GnRH-III(⁴Lys(X), ⁸Lys(Dau=Aoa)) konjugátumok cirkuláris dikroizmus spektroszkópiai vizsgálata

A CD spektroszkópiai analíziseket Jasco J-715 spektropolariméteren végeztem 25°C-on 0,05 cm úthosszúságú kvarc cellában állandó nitrogén áramban. A készüléket 0,06% (w/v) (+)-ammónium-kámforszulfonát vizes oldatára kalibráltam (Katayama Chemical, Japán). A méréseket vízben illetve trifluoretanolban végeztem el. A konjugátumokból 500 µM koncentrációjú oldatokat készítettem. A spektrumokat hat spektrum átlagaként kaptam meg, amelyeket λ=180 és 400 nm között vettem fel. A moláris ellipticitást (deg cm² dmol⁻¹), mint eredményt, az oldószer alapvonalának kivonása után ábrázoltam a hullámhossz függvényében (21. ábra).

6.3.6 Biokonjugátumok lipofilitásának vizsgálata

6.3.6.1 A GnRH-III(⁴Lys(X), ⁸Lys(Dau=Aoa)) konjugátumok víz-oktanol megoszlási hányadosának meghatározása

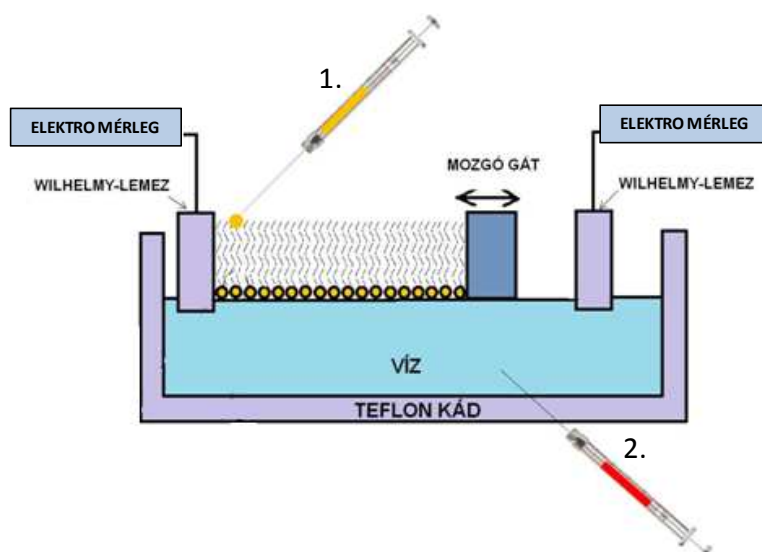
A GnRH-III(⁴Lys(X), ⁸Lys(Dau=Aoa)) konjugátumok logP értékeit a klasszikus rázótolcséres módszerrel, RP-HPLC detektálással kombinálva határoztam meg (22. ábra).¹⁹⁵

A konjugátumok víz-oktanol megoszlási hányadosának meghatározásához első lépésben

egymással telített ioncserélt vizet és oktanolt készítettem. Majd mérőlombikokba minden egyes konjugátumból 1 mg-ot mértem be, amire 1-1 ml vízzel telített oktanolt és oktanollal telített vizet rétegeztem, majd összeráztam ultrahangos fürdőben. Ezt követően egy éjszakán át hagytam a két fázist szétválni. A következő napon mind a két fázisból 5-5 párhuzamost mértem KNAUER RP-HPLC rendszeren. A méréseket a következő körülmények között végeztem: kromatográfiás oszlop: Phenomenex Luna C18; 250x4,6 mm; 100 μ m; 100Å; λ =220 nm; gradiens: 0-90B%; 50 perc; eluensek: A eluens: 0,1 tf% TFA/H₂O; B eluens: 0,1 tf% TFA/AcN:H₂O=80:20 tf%.

6.3.6.2 Langmuir mérleges mérések: A GnRH-III(⁴Lys(X), ⁸Lys(Dau=Aoa)) biokonjugátumok penetrációja DPPC monorétegbe

A lipid rétegek kialakítását és a penetrációs vizsgálatokat két, különálló Wilhelmy-lemezes ($\pm 0,05$ mN/m pontosságú) felületi feszültségmérővel felszerelt, automatizált teflon Langmuir-mérleggel (KSV MiniMicro, (5×20×0,6 cm) végeztük (43.ábra), $23,0 \pm 0,5$ °C-os hőmérsékleti intervallumban.¹⁷⁰



45. ábra: Penetráció vizsgálata Langmuir-mérleggel

A mérés előtt a készüléket diklórmétánnal, metanollal és desztillált vízzel mostuk. Szubfázisként kétszer desztillált vizet alkalmaztunk. A Langmuir-monoréteg kialakításához 1,0 g/l koncentrációjú kloroformban oldott DPPC (1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-foszfatidilkolin) lipid oldatot használtunk, amelyből 13 μ l mennyiséget Hamilton fecskendővel a vizes szubfázis felszínére csepegtettünk (1. fecskendő). A lipid oldat oldószerének elpárolgására 10 percet hagytunk, mielőtt a gát mozgatásával felvettük az izotermát. Minden mérésnél háromszor ismételtük meg a komprimálási/expandálási ciklust, állandó sebességgel (10 cm²/perc) mozgó gáttal, hogy felvegyük a felületi feszültség vs.

terület izotermákat. Majd a monoréteget a komprimációhoz használt sebességgel összenyomtuk úgy, hogy a felületi feszültség az előre meghatározott 15 vagy 25 mN/m érték legyen. A felületi feszültség érték beállítása után a GnRH-III(⁴Lys(X), ⁸Lys(Dau=Aoa)) (1-7) konjugátumok vizes oldatának adott mennyiségét injektáltuk (2. fecskendő) a lipid réteg alá úgy, hogy a szubfázis végső konjugátum koncentrációja 2 µg/ml legyen. A felületi feszültség változását, mint a lipid-konjugátum kölcsönhatását (penetráció) az idő függvényében rögzítettük egy órán keresztül. A konjugátum monorétegbe történő penetrációja ($\Delta\pi$ a felületi feszültség változása) két független mérés átlagának eredménye volt (standard deviáció ± 0.5 mN/m).

6.3.7 A GnRH-III(⁴Lys(X), ⁸Lys(Dau=Aoa)) biokonjugátumok ligandum kompetíciós vizsgálata

A GnRH-III(⁴Lys(nBu), ⁸Lys(Dau=Aoa)) GnRH receptorokhoz való kötődését humán hipofízis és humán prosztata tumorszöveten végzett ligand kompetíciós vizsgálatokkal határoztuk meg. Az egészséges humán hipofízis mintákhoz boncolások során, a humán prosztata tumor mintákhoz pedig sebészeti beavatkozásokon átesett betegektől jutottunk. A kísérletek tervezését és kivitelezését a Debreceni Egyetem Orvos - és Egészségtudományi Centrum Etikai Bizottsága által jóváhagyott protokollok szerint hajtottuk végre. A vizsgálatok Dr. Halmos Gábor és Dr. Sipos Éva segítségével készültek.

A vizsgálatokhoz a membrán preparációt az alábbiakban leírtak alapján készítettük el.¹⁹⁶ A fagyasztva tárolt szövetmintákat felolvasztottuk, megtisztítottuk, majd 50 mM Tris-HCl pufferben (pH= 7,4) homogenizáltuk folyamatos hűtés mellett szöveti homogenizátorban (Ultra-Turrax tissue homogenizer IKA Works, Wilmington, NC, USA). A puffer proteáz inhibitorokat tartalmazott a fehérjebontó enzimek aktivitásának csökkentése céljából (0,25 mM fenil-metil-szulfonil fluorid (PMSF), 0,4 t% aprotinin és 2 µg/ml pepstatin A). A nukleáris sejtösszetevőket és a lipid frakciót centrifugálással választottuk el, amelynek során a szövet homogenizátumot centrifugáltuk (10 perc, 500g, 4°C). Az üledéket friss pufferben szuszpendáltuk és ultracentrifugában centrifugáltuk (70000g, 50 perc, 4°C) (Beckman L8-80M, Beckman Coulter Magyarország Kft.). A pelletet homogenizáló pufferben újraszuszpendáltuk és a ligand kötési vizsgálatok elvégzéséig -80°C-on tároltuk. A fehérje koncentrációt Bradford módszerrel határoztuk meg Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) segítségével a gyártó leírásának megfelelően.

A direkt leszorítási un. ligand kompetíciós vizsgálatok során radioaktívan jelölt GnRH-I származékot használtunk, amelyekhez a radioaktívan jódozott GnRH-I analógot ([¹²⁵I][D-

Trp⁶]GnRH-I) chloramine-T módszerrel állítottuk elő. A 150 µl végtérfogatú membrán preparátum elegyben (50-160 µg fehérjetartalom) található receptorkötőhelyeket 60-80000 percenkénti beütésszámú (cpm: counts per minute) [¹²⁵I][D-Trp⁶]GnRH-I ligandummal inkubáltunk. A radioaktívan jelölt GnRH-I ligandumot a kötési helyekről a jelöletlen GnRH-III származék, növekvő koncentrációival (10⁻¹²-10⁻⁶ M) szorítottuk le. Minden esetben 3 mérést végeztünk. Az inkubációt követően a szuszpenzióból 125 µl mennyiséget 1 ml jéghideg 1,5%-os marha szérumból albumint tartalmazó kötő puffer felszínére rétegeztük és szilikonnal bevont polipropilén centrifugacsőben centrifugáltuk (3 perc, 12000g, 4°C) (Beckman J2-21M, Beckman Coulter Magyarország Kft.). A felülúszót leszívtuk a pelletről. A radioaktív detektáláshoz a percenkénti beütésszámot mérő gamma sugármérő (gamma counter: Micromedic System, Huntsville, AL, USA) készüléket használtunk.

A konjugátumok receptor kötődési kapacitását Munsun és Rodbrand szerinti Ligand-PC “curve fitting” program segítségével határoztuk meg.¹⁹⁷

6.3.8 A GnRH-III(⁴Lys(nBu), ⁸Lys(Dau=Aoa)) *in vivo* tumorelles hatása ortotopikus HT-29 xenografton

Az *in vivo* vizsgálatok során használt 6-8 hetes ivarérett NSG (NOD scid gamma) nőstény egereket az Országos Onkológiai Intézet Kísérletes Farmakológiai Osztályának SOPF (specified opportunistic pathogen free) állatházában tenyésztették és az *in vivo* vizsgálatokat is itt végeztük Schulcz Ákos és Kapuvári Bence segítségével. Az állatokat 22-24°C-on 40-50% páratartalom és 12/12 órás fény/sötét periódus mellett tartották lamináris boxban. Az állatokat Charles River 801902 VRF1 (P) táppal etették és sterilizált vízzel (pH=3, sósavval beállítva) itatták.

Előzetesen meghatároztuk a daunorubicin *in vivo* toxicitását 1 és 2 mg/testtömeg kg koncentrációban. A daunorubicint desztillált vízben oldottuk fel. Az egereket *i.p.* kezeltük 1 mg vagy 2 mg /testtömeg kg szabad daunorubicinnel. A vizsgálatban résztvevő csoportok: 1) kontroll, 2) daunorubicinnel kezelt állatok.

A csoportok mindegyike három egeret tartalmazott. A kezelések az 1., 4., 7., 10., 13. napon történtek. A kísérlet 21 napig tartott.

A kezelés során bekövetkező toxicitást két paraméter segítségével határoztuk meg az alapján, hogy a kezelést követően az állatok mennyi ideig maradtak életben, illetve az egerek testtömeg változása alapján (23. ábra).

Az *in vivo* antitumor hatás vizsgálatokhoz az egerek vakbelére körülbelül 2 mm³ nagyságú HT-29 daganat darabkát varrtunk mikrosebészeti technikával.

A kezeléseket az első kísérlet esetén a beültetést követő 4. napon kezdtük el. Az állatok a konjugátum esetében a 4., 8., 12., 16., 20., 24., 28. napokon, a szabad daunorubicin esetén a tumor transzplantációt követő 4., 11., 18., 25. napokon kaptak a vízben oldott vizsgált anyagokból. A következő csoportokat vizsgáltuk: 1.) kontroll (8 egér); 2.) daunorubicinnal (7 egér); 3.) GnRH-III(⁴Lys(nBu), ⁸Lys(Dau=Aoa)) (6 egér) konjugátummal kezelt. A dózis a konjugátum esetén 0,68 μ mol/egér/injektálás (15 mg/ttkg daunorubicin tartalom), míg a szabad hatóanyag esetében a toxicitás vizsgálat alapján meghatározott 1 mg/ttkg volt. A kísérlet a tumorbeültetést követően 33 napig tartott. A vegyületek tumornövekedést gátló hatását a terminálás után a kioperált tumor tömegmérésével állapítottuk meg. A májtoxicitás és a mikrometasztázisok megvizsgálása érdekében a tumoron kívül az állatok máját, lépét, szívét, tüdejét és veséjét formalinban illetve folyékony nitrogénben raktuk el.

A második kísérlet során a kezeléseket a beültetést követő 5. napon kezdtük el. Az állatok a konjugátum esetében 4 naponta, összesen 13-szor, szabad daunorubicint hetente 1-szer kaptak a vízben oldott vizsgált anyagokból. A vizsgálatban a következő csoportok szerepeltek: 1.) kontroll (7 egér); 2.) daunorubicinnal (7 egér); 3.) GnRH-III(⁴Lys(nBu), ⁸Lys(Dau=Aoa)) konjugátummal (8 egér) kezelt. A daunorubicin dózisa 1 mg/ttkg volt (*i.v.*). A dózis a konjugátum esetén daunorubicin tartalomra nézve az első 5 kezelés alkalmával 15 mg/ttkg volt (4x *i.v.*, majd az 5. *i.p.* adagolva), míg 6.-13. kezelés dózisa 7,5 mg/ttkg volt (*i.p.*). A kísérlet a tumorbeültetést követő 50. napig tartott. A vegyületek tumornövekedést gátló hatását a terminálást követően a tumorok tömegmérésével állapítottuk meg. A májtoxicitás és a mikrometasztázisok megvizsgálása érdekében a tumoron kívül az állatok máját, lépét, szívét, tüdejét és veséjét ugyancsak formalinban vagy folyékony nitrogénben raktuk el.

6.4 Négyes helyzetben vajsavval módosított két daunorubicint tartalmazó

GnRH-III biokonjugátumok szintézise és vizsgálata

6.4.1 A GnRH-III(⁴Lys(nBu), ⁸Lys(Dau=Aoa-X-Lys(Dau=Aoa-X))) konjugátumok előállítása (X=Ø vagy GFLG)

6.4.1.1 A GnRH-III(⁴Lys(nBu), ⁸Lys(Aoa-X-Lys(Aoa-X))) peptidek szintézise (X= Ø vagy GFLG)

A 4-es pozícióban vajsavval acilezett lizint tartalmazó és a 8-as pozícióban a lizin ϵ -aminocsoportján újabb lizinnel meghosszabbított GnRH-III származékok előállítása Fmoc/^tBu

stratégiával Rink-Amid MBHA gyantán (0,63 mmol/g, 1000 mg) manuálisan végeztem a 6.2.1. pontban leírt protokoll alapján, amelyet a 29. ábrán foglaltam össze.

A következő Fmoc-védett aminosavszármazékokat alkalmaztam a szintézishez: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Lys(Mtt)-OH, Fmoc-Trp-OH, Fmoc-Asp(O^tBu)-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Dde)-OH, Fmoc-Lys(Fmoc)-OH.

A 10 aminosavas alaplánc felépítése után a 4-es helyzetű lizin oldalláncán lévő Dde védőcsoportot 2% hidrazin/DMF tf% elegyével lehasítottam (6 x 5 perc), majd az ε-amino-csoportot vajsavval acileztem 3 ekvivalens vajsav-anhidrid : DIEA (1:1-mol/mol) DMF-os oldatával 1 órás reakcióidővel. Majd az Mtt védőcsoport eltávolítása következett a 8-as helyzetben 2% TFA, 2% TIS/DCM tf% elegyével a már korábban leírt módszerrel. Ezután a szabaddá vált ε-aminocsoporthoz Fmoc-Lys(Fmoc)-OH lizin származékot kapcsoltam.

Majd a gyantát két részre osztottam. A gyantamennyiség egyik feléhez Boc-Aoa-OH-t kapcsoltam DIC, HOBt kapcsoló reagensekkel (3-3 ekvivalens mindkét aminocsoportra nézve) 2 órás reakcióidővel manuálisan. A másik felén a lizin aminocsoportjain Gly-Phe-Leu-Gly spacer szekvenciát építettem ki, majd az Fmoc-csoport lehasítása után Boc-Aoa-OH-t kapcsoltam az elágazás mindkét végére.

A kész peptideket a gyantáról 95% TFA, 2,5% H₂O, 2,5% TIS (tf%) hasítóeleggyel (10 ml) aminosavfelesleg jelenlétében hasítottam le, az előző szintézisekkel (6.3 fejezet) megegyezően. A nyerstermékeket RP-HPLC-vel tisztítottam, tisztítás után a termékeket liofilizálás nélkül, az oldószer eltávolítását követően azonnal felhasználtam a következő konjugálási lépésben a peptidek érzékenysége miatt. A peptidekből egy kis mennyiséget liofilizáltam analízis céljából (analitikai RP-HPLC, ESI-MS) (9. táblázat, Függelék: **F19.-F20. ábra**).

6.4.1.2 Konjugálás daunorubicinhez, oxim-kötés kialakítása: GnRH-III(⁴Lys(nBu), ⁸Lys(Dau=Aoa-X-Lys(Dau=Aoa-X))) konjugátumok (X= Ø vagy GFLG)

A konjugálási reakciókat, a peptidek aminosav-oxiacetil-csoportjai és a daunorubicin 13-as C-atomján lévő karbonilcsoportja közötti oxim-kötés kialakítását 10 mg/ml-es peptid koncentrációval 0,2M NH₄OAc (pH=5,0) oldatban végeztem. A daunorubicint a peptidhez képest 50% feleslegben alkalmaztam (a HPLC tisztítást követő bepárlás után a lombik tömegnövekedéséből számolt peptid mennyiségére számolva). A konjugálást szobahőmérsékleten, folyamatos kevertetés mellett végeztem 16 órán keresztül. Majd a reakcióelegyeket RP-HPLC-vel megtisztítottam. A frakciókat folyékony N₂-ben

lefagyasztottam, liofilizáltam, analitikai RP-HPLC és ESI-MS módszerekkel jellemeztem (10. táblázat, Függelék: F21-F22. ábra).

6.4.1.3 A GnRH-III(⁴Lys(nBu), ⁸Lys(Dau=Aoa-X-Lys(Dau=Aoa-X)))

konjugátumok *in vitro* citosztatikus hatásának vizsgálata

A konjugátumok *in vitro* citosztatikus hatását HT-29 humán vastagbél adenokarcinóma sejteken és MCF-7 humán emlő adenokarcinóma sejteken vizsgáltam MTT-tesztel a 6.3.3. pontban leírt protokoll alapján 6 órás kezelési időt alkalmazva (11. táblázat)

6.4.2 A GnRH-III(⁴Lys(nBu), ⁸Lys(Dau=Aoa-X-O₂Oc)-Lys(Dau=Aoa-X-O₂Oc)))

konjugátumok szintézise (X= Ø vagy GFLG)

Az etilén-glikol származékot tartalmazó analógokat Fmoc/^tBu stratégiával Rink-Amid ChemMatrix gyantán (0,52 mmol/g, 1000 mg) Prelude automata peptidszintetizátorral (Protein Technologies, Tucson, AZ, USA) állítottam elő a 6.2.3. pontban leírt protokoll alapján David Andreu professzor kutatócsoportjában a Pompeu Fabra Egyetemen, Barcelonában. A szintézis menetét a 30. ábrán foglaltam össze.

A következő Fmoc-védett aminosavszármazékokat alkalmaztam a szintézis során: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Lys(Mtt)-OH, Fmoc-Trp-OH, Fmoc-Asp(O^tBu)-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Dde)-OH, Fmoc-Lys(Fmoc)-OH.

Az előző szintézissel megegyezően az alaplánc felépítése után a 4-es helyzetű lizin oldalláncán lévő Dde védőcsoportot 2% hidrazin/DMF tf% elegyével lehasítottam (6 x 5 perc), majd az ε-aminocsoportot vajsavval acileztem 3 ekvivalens vajsav-anhidrid : DIEA (1:1, mol/mol) DMF-os oldatával 1 órás reakcióidővel. Majd lehasítottam az Mtt védőcsoportot a 8-as helyzetben (2% TFA, 2% TIS/DCM tf%). A szabaddá vált ε-aminocsoporthoz Fmoc-Lys(Fmoc)-OH lizin származékot kapcsoltam (3 ekv. a gyantakapacitásra nézve), majd lehasítottam róla az Fmoc-védőcsoportokat és Fmoc-O₂Oc-OH-t (O₂Oc= 8-amino-3,6-dioxaoktánsav) kapcsoltam mind az α- mind pedig az ε-aminocsoporthoz. Majd a gyantát két részre osztottam és külön folytattam a szintézist. A gyantamennyiség egyik feléhez manuálisan Boc₂-Aoa-OH-t kapcsoltam DIC, HOBT kapcsoló reagensekkel (3-3 ekvivalens mind két aminocsoportra nézve) 2 órás reakcióidővel (GnRH-III(⁴Lys(nBu), ⁸Lys(Aoa-O₂Oc-Lys(Aoa-O₂Oc))). A másik felén peptid szintetizátor segítségével építettem tovább a peptidet. Gly-Phe-Leu-Gly szekvenciát építettem ki a lizin mindkét aminocsoportján, majd az Fmoc-csoport hasítása után az előbbi módon manuálisan Boc-Aoa-OH-t kapcsoltam az elágazás mindkét terminálisára (GnRH-III(⁴Lys(nBu),

$^8\text{Lys}(\text{Aoa-GFLG-O}_2\text{Oc-Lys}(\text{Aoa-GFLG-O}_2\text{Oc})))$. Ezután a gyantákat absz. etanollal mostam és exsikkátorban szárítottam.

Az elkészült peptidek hasítása, tisztítása és analízise majd a konjugátumok elkészítése és feldolgozása az etilén-glikol származékot nem tartalmazó peptidekkel azonos módon történt (analitikai RP-HPLC, ESI-MS) (12. és 13. táblázat, Függelék F23.-F26. ábra).

6.4.3 A GnRH-III($^4\text{Lys}(\text{nBu})$, $^8\text{Lys}(\text{Dau=Aoa-X-Y-Lys}(\text{Dau=Aoa-X-Y})))$ konjugátumok oldékonyság vizsgálatai (X= Ø vagy GFLG, Y= Ø vagy O₂Oc)

6.4.3.1 A GnRH-III($^4\text{Lys}(\text{nBu})$, $^8\text{Lys}(\text{Dau=Aoa-X-Y-Lys}(\text{Dau=Aoa-X-Y})))$ konjugátumok oldékonyság vizsgálata tömegmérés alapján

A GnRH-III($^4\text{Lys}(\text{nBu})$, $^8\text{Lys}(\text{Dau=Aoa-X-Y-Lys}(\text{Dau=Aoa-X-Y})))$ konjugátumok tömegmérésen alapuló oldhatósági vizsgálatát vízben végeztem el. A 30 mg konjugátumot 1,2 ml deszt. vízben oldottam fel. Majd 24 óra elteltével a mintát lecentrifugáltam (6000 rpm perc). A felülúszóból 1 ml-t liofilizáltam és vákuum exsikkátorban P₂O₅ felett szárítottam tömegállandóságig, majd lemértem analitikai mérlegen.^{176,177,178}

6.4.3.2 A GnRH-III($^4\text{Lys}(\text{nBu})$, $^8\text{Lys}(\text{Dau=Aoa-X-Y-Lys}(\text{Dau=Aoa-X-Y})))$ konjugátumok folyadékkromatográfiás módszeren alapuló oldékonyság vizsgálata

Első lépésben a konjugátumok deszt. vizes oldataiból egy standard görbét vettem fel. A GnRH-III($^4\text{Lys}(\text{nBu})$, $^8\text{Lys}(\text{Dau=Aoa-X-Y-Lys}(\text{Dau=Aoa-X-Y})))$ (X= Ø vagy GFLG, Y= Ø vagy O₂Oc) biokonjugátumok oldékonyságát DMEM sejttenyésztő médiumban vizsgáltam: a konjugátumokat vízben oldottam, majd médiummal hígítottam úgy, hogy 100 µM-os végkoncentrációt érjek el, a víz pedig a teljes oldószer mennyiség 20%-a legyen. Az így kapott oldatot 15 percig szobahőmérsékleten inkubáltam, majd lecentrifugáltam (5 perc 13000 rpm). A felülúszóból kivettem akkora térfogatú oldatot, amennyi eredetileg tartalmazhatna 30 µg konjugátumot (úgy tekintve a 100 µM-os oldatra, hogy abban a vegyület teljesen feloldódott), majd ezt 500 µl-re hígítottam A eluenssel a pH beállításának céljából, majd analitikai RP-HPLC-re injektáltam. A vizsgálatokat Exformma EX1600 HPLC rendszeren végeztem Zorbax SB-C18 oszlopon (150x4,6 mm, 5µm szilika, pórus méret 80 Å) gradiens elúciót alkalmazva (0 perc 0 % B; 5 perc 0 % B; 55 perc 100 % B), λ=280 nm-en detektálva. Mind az eluensek, mind pedig a médium kromatogramját felvettem, a nem a mintákból származó csúcsok beazonosítása érdekében. A standard görbe alapján extrapoláció

segítségével meghatároztam a médiumban oldott biokonjugátumok mennyiségét (15. táblázat).

6.4.4 A GnRH-III(⁴Lys(nBu), ⁸Lys(Dau=Aoa-X-Y-Lys(Dau=Aoa-X-Y)))

konjugátumok *in vitro* citosztatikus hatásának vizsgálata

A konjugátumok *in vitro* citosztatikus hatását HT-29 és MCF-7 sejteken vizsgáltam MTT-teszttel a 6.3.3. pontban leírt protokoll alapján 6 órás kezelési időt alkalmazva (16. táblázat).

6.5 Négyes helyzetben vajsavval módosított 2-pirrolino-daunorubicin-GnRH-III biokonjugátum szintézise és *in vitro* biológiai

6.5.1 A GnRH-III(⁴Lys(nBu), ⁸Lys(Aoa)) peptid előállítása

A 4-es pozícióban vajsavval acilezett lizint és a 8-as pozícióban aminooxiacetilezett lizint tartalmazó GnRH-III analógot a 6.3.1. pontban leírtak alapján állítottam elő.

6.5.2 Konjugálási reakció: oxim-kötés kialakítása az aminooxiacetilezett peptid és 2-pirrolino-daunorubicin származék között: GnRH-III(⁴Lys(nBu), ⁸Lys(PyrDau=Aoa)) konjugátum előállítása

Első lépésben a konjugálási reakciót a korábbi példákhoz hasonlóan hajtottam végre, amelyekben oxim-kötést alakítottam ki (0,2M NH₄OAc, pH=5,0 puffer). Azonban a tisztítás és analízis után kiderült, hogy a reakció nem ment végbe, a kiindulási vegyületeket kaptam vissza. Ezért elvégeztem egy próba reakciót desztillált vízben (V=1 ml). A reakciót analitikai RP-HPLC-vel követtem, a frakciókat összegyűjtöttem és tömegspektrometriával analizáltam, amelynek eredménye megmutatta, hogy a reakció végbement. Ezért a konjugálást elvégeztem nagyobb mennyiségben is 10 mg/ml-es peptid koncentrációval, desztillált vízben, 16 órás reakcióidővel szobahőmérsékleten állandó kevertetés mellett. A reakció a méret növelés (V=14 ml) után is sikeres volt. Majd a reakcióelegyet RP-HPLC-vel megtisztítottam. A frakciókat folyékony N₂-ben lefagyasztottam, liofilizáltam, analitikai RP-HPLC és ESI-MS alkalmazásával jellemeztem (17. táblázat, Függelék: F28. ábra).

6.5.3 A GnRH-III(⁴Lys(nBu), ⁸Lys(PyrDau=Aoa)) konjugátumok *in vitro* citosztatikus hatásának vizsgálata

A konjugátumok *in vitro* citosztatikus hatását HT-29 és MCF-7 sejteken vizsgáltam

MTT-módszerrel a 6.3.3. pontban leírt protokoll alapján (18. táblázat).

6.6 Négyes helyzetben vajsavval módosított daunorubicin-GnRH-I és daunorubicin-GnRH-II biokonjugátumok szintézise és *in vitro* biológiai vizsgálata

6.6.1 A GnRH-I(⁴Lys(nBu), D-⁶Lys(Dau=Aoa)) és a GnRH-II(⁴Lys(nBu), D-⁶Lys(Dau=Aoa)) konjugátumok előállítása

6.6.1.1 A GnRH-I(⁴Lys(nBu), D-⁶Lys(Aoa)) és a GnRH-II(⁴Lys(nBu), D-⁶Lys(Aoa)) peptidek szintézise

A 4-es pozícióban vajsavval acilezett lizint, a 6-os helyzetben glicin helyett aminooxiacetilezett D-lizint tartalmazó GnRH-I (Glp-His-Trp-Lys(nBu)-Tyr-D-Lys(Aoa)-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂) és GnRH-II analógok (Glp-His-Trp-Lys(nBu)-His-D-Lys(Aoa)-Trp-Tyr-Pro-Gly-NH₂) előállítását Fmoc/^tBu stratégiával Rink-Amid MBHA gyantán (0,52 mmol/g, 1000 mg) manuálisan a 6.2.1. pontban leírt protokoll alapján hajtottam végre, amelyet a 33. és 34. ábrán foglaltam össze. A következő Fmoc-védett aminosav származékokat alkalmaztam a szintézisekhez: Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Tyr(^tBu)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Trp-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-D-Lys(Mtt)-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Dde)-OH.

Ahogy a GnRH-III analógok szintézisének is, a [^D-Lys⁶]GnRH-I és a [^D-Lys⁶]GnRH-II alapláncának felépítése után a 4-es helyzetű lizinek oldalláncán lévő Dde védőcsoportot 2% hidrazin/DMF t⁰% elegyével hasítottam le (6 x 5 perc), majd az ε-aminocsoportot vajsavval acileztem 3 ekvivalens vajsav-anhidrid : DIEA (1:1 - mol/mol) DMF-os oldatával 1 órás reakcióidővel. Ezt követően lehasítottam az Mtt védőcsoportot a 6-os helyzetű D-lizintről (2% TFA, 2% TIS/DCM t⁰%). A szabaddá vált ε-aminocsoporthoz Boc-Aoa-OH-t kapcsoltam DIC, HOBT kapcsoló reagenssel (3-3 ekv. mindkét aminocsoportra nézve) 2 órás reakcióidővel. Ezután a gyantát absz. etanollal mostam és exsikkátorban szárítottam.

A kész peptideket a gyantáról 95% TFA, 2,5% H₂O, 2,5% TIS t⁰% hasítóeleggyel (10 ml) aminooxiacetsav felesleg jelenlétében hasítottam le, az előző szintézisekkel (6.3 fejezet) megegyezően. A nyerstermékeket RP-HPLC-vel tisztítottam, tisztítás után a termékeket liofilizálás nélkül, az oldószer eltávolítását követően azonnal felhasználtam a következő konjugálási lépésben a peptidek érzékenysége miatt. A peptidekből egy kis mennyiséget liofilizáltam analízis céljából (analitikai RP-HPLC, ESI-MS) (19. táblázat, Függelék: **F29.-**

F30. ábra).

6.6.1.2 A [D-Lys⁶]GnRH-I és a [D-Lys⁶]GnRH-II származékok konjugálása daunorubicinhez oxim-kötésen keresztül: GnRH-I(⁴Lys(nBu), D-⁶Lys(Dau=Aoa)) és a GnRH-II(⁴Lys(nBu), D-⁶Lys(Dau=Aoa)) konjugátumok

A konjugálási reakciókat 10 mg/ml-es peptid koncentrációval 0,2M NH₄OAc (pH=5,0) oldatban, szobahőmérsékleten, folyamatos kevertetés mellett végeztem 16 órán keresztül 1,5 ekvivalens daunorubicin feleslegével. Majd a reakcióelegyeket RP-HPLC-vel megtisztítottam. A frakciókat folyékony N₂-ben lefagyasztottam, liofilizáltam, analitikai RP-HPLC és ESI-MS segítségével jellemeztem (20. táblázat, Függelék: F31.-F32. ábra).

6.6.2 A GnRH-I(⁴Lys(nBu), D-⁶Lys(Dau=Aoa)) és a GnRH-II(⁴Lys(nBu), D-⁶Lys(Dau=Aoa)) konjugátumok *in vitro* citosztatikus hatás vizsgálata

A konjugátumok *in vitro* citosztatikus hatását HT-29 humán vastagbél adenokarcinóma sejteken vizsgáltam MTT-teszttel a 6.3.3. pontban leírt protokoll alapján (21. táblázat).

6.7 Irányított tumorterápiában alkalmazható kurkumin tartalmú vegyület előállítása és vizsgálata

6.7.1 Kurkumin tartalmú GnRH-III konjugátum szintézise

A konjugátum előállítása klikk-reakcióval történt, amelyhez azid, illetve alkin funkcióval rendelkező reakciópartnerekre volt szükségem. Az azid származékot a GnRH-III-ból, az alkint a kurkuminből alakítottam ki.

6.7.1.1 8-as pozícióban azid csoportot tartalmazó GnRH-III analóg előállítása

A 8-as pozícióban azid csoportot tartalmazó etilén-glikol távtartóegységgel meghosszabbított GnRH-III származékot manuálisan Rink-Amid MBHA gyantán állítottam elő Fmoc/^tBu stratégiával (35. ábra), a 6.3 fejezetben leírt GnRH-III szintézishez hasonlóan. Az alaplánc felépítése után a 8-as pozícióban található lizin ε-aminocsoportjáról eltávolítottam az ivDde védő csoportot 2% hidrazin/DMF elegyével (6×5 perc), majd glutársav-anhidriddel acileztem, így alakítva ki karboxil funkciót az oldalláncon, annak érdekében, hogy az azid végcsoporttal rendelkező etilén-glikol származékot amid-kötés kialakításával kapcsolhassam szilárdfázison. A 11-azido-3,6,9-trioxaundekán-1-amint DIC és HOBt kapcsoló reagensekkel kapcsoltam. A gyantát absz. etanollal mostam majd

exszikkátorban szárítottam.

A kész peptidet a gyantáról 95% TFA, 2,5% H₂O, 2,5% TIS t^o% hasítóeleggyel (10ml) hasítottam. A gyantán lévő peptidet a hasítóeleggyel 15 percen keresztül jeges hűtéssel (0°C-on), majd 1,5 órán át szobahőmérsékleten kevertettem. Ezután a peptidet 100 ml hideg dietiléterbe szűrtem. A gyantát trifluorecetsavval, majd diklórmétánnal mostam. A fehér csapadékot centrifugálással ülepittem 5 percig 4000/perc fordulaton. Az üledékről az étert dekantálással eltávolítottam, majd a peptidet az előzőekhez hasonlóan hideg éterben háromszor mostam. Ezután desztillált vízben feloldottam a peptidet. Az oldatot folyékony N₂-ben lefagyasztottam, majd liofilizáltam. A nyersterméket RP-HPLC-vel tisztítottam, tisztítás után a terméket liofilizáltam, majd analitikai RP-HPLC és ESI-MS segítségével jellemeztem (22. táblázat, Függelék F33. ábra).

6.7.1.2 Kurkumin propargil származékának előállítása

A kurkumin éteresítését ekvivalens mennyiségű propargil-bromiddal hajtottam végre K₂CO₃ bázis jelenlétében argon atmoszféra alatt, szobahőmérsékleten, DMF oldószerben (36. ábra). A pontos beméréseket a 35. táblázatban tüntettem fel. A reakcióelegyet vékonyréteg kromatográfiával követtem, majd 3 nap kevertetés után dolgoztam fel. Az elegyet vákuumban bepároltam, majd A eluenst (0,1% TFA/deszt. víz) adtam hozzá. A hidrofób kiindulási kurkumin és a termékek kicsapódtak a vizes oldatban, amit ezután centrifugálással ülepittem. A csapadékot RP-HPLC-vel tisztítottam. A nyerstermékből csak annyit tisztítottam meg, ami elegendő volt a következő reakciók elvégzéséhez. A folyadékkromatográfiás tisztítás során sikerült elválasztanom egymástól a kiindulási kurkumint, illetve a képződött mono- és a dialkin-származékot, amelyeket ESI-MS-rel azonosítottam (22. táblázat, Függelék: F34. ábra)

35. táblázat: A kurkumin-alkin előállítási reakcióban alkalmazott bemérések

Reaktáns	Moláris tömeg (g/mol)	Sűrűség (g/cm ³)	Anyagmennyiség (mmol)	Bemért tömeg/térfogat
Kurkumin	368,3		13,8	5,1 g
Propargil-Br	118,9	1,57	14,7	1,1 ml
K ₂ CO ₃	138,2		13,9	1,9 g
DMF	129,2			60 ml

6.7.1.3 Klikk-reakció: GnRH-III(⁸Lys(kurkumin-triazol)) előállítása

Első lépésben a kurkumin propargil származékával egy modell reakciót hajtottam végre, amelyben a kurkumin-származék és benzil-azid között lejátszódó azid-alkin 1,3-dipoláris

cikloaddíciót vizsgáltam meg (37. ábra). A reakciót szobahőmérsékleten réz(I) katalízissal ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (20 n/n%), Na-aszkorbát (40 n/n%)), ${}^t\text{BuOH}:\text{CHCl}_3=4:1$ tf% oldószerkeletben hajtottam végre (36. táblázat).

36. táblázat: A próba klikk-reakcióban alkalmazott bemérések

Reaktáns	Moláris tömeg (g/mol)	Sűrűség (g/cm ³)	Anyagmennyiség (μmol)	Bemért tömeg/térfogat
Kurkumin-monoalkin	406,3		12,3	5 mg
Benzil-azid	133,1	1,065	$1,47 \cdot 10^2$	1,54 μl
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	249,7		2,7	0,68 mg
Na-aszkorbát	198,1		4,9	0,97 mg

A reakciót analitikai RP-HPLC-vel követtem (2 napig, Függelék: F35. ábra), a komponenseket pedig ESI-MS segítségével azonosítottam (22. táblázat, Függelék: F36. ábra). Mivel a tömegspektrometriás mérések azt mutatták, hogy a két vegyület között a triazol gyűrű kialakult, ezért a reakciót a GnRH-III azid származékával is elvégeztem a 37. táblázatban feltüntetett mennyiségekkel 200 μl ${}^t\text{BuOH}$ -50 μl CHCl_3 elegyében.

37. táblázat: A klikk-reakcióban alkalmazott bemérések

Reaktáns	Moláris tömeg (g/mol)	Anyagmennyiség (μmol)	Bemért tömeg/térfogat
Kurkumin-monoalkin	406,3	6,3	2,58 mg
GnRH-III(⁸ Lys(azid))	1573,8	6,3	10 mg
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	249,7	6,3	1,58 mg
Na-aszkorbát	198,11	2,5	0,5 mg

A reakciót párhuzamosan más összetételű oldószerkeletben (200 μl ${}^t\text{BuOH}$, 50 μl CHCl_3 , 250 μl desztillált víz) is elvégeztem. Mivel a reakcióelegyben csapadék kiválást vettem észre, ezért 50 μl acetonitrilt adtam hozzá. A reakciókat analitikai RP-HPLC-vel követtem. Mivel nem tapasztaltam átalakulást, ezért a reakcióelegyekhez réz-jodidot és TBTA komplexképző vegyületet (tris[$(1\text{-benzil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil}$ amin) adtam. A reakcióelegyeket 3 nap elteltével RP-HPLC-vel megtisztítottam. A reakcióelegyekből minimális mennyiségű terméket sikerült kinyernem (Függelék: F37.-F38. ábra).

6.8 Daunorubicin tartalmú szomatosztatin analóg biokonjugátumok szintézise

6.8.1.1 Az N-terminálisán aminosav-csoporttal módosított RC-121 származék előállítása (Aoa-D-Phe-c[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Cys]-Thr-NH₂)

A peptid szintézislépéseit a 39. ábrán ábrázoltam. Első lépésben a lineáris RC-121

szomatosztatin analógot állítottam elő Fmoc/^tBu stratégiával Rink-Amid MBHA gyantán (0,65 mmol/g, 1000 mg) manuálisan a 6.2.1. pontban leírt protokoll alapján. A következő Fmoc-védett aminosavszármazékokat alkalmaztam a szintézishez: Fmoc-Thr(^tBu)-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Lys(ivDde)-OH, Fmoc-D-Trp-OH, Fmoc-Tyr(^tBu)-OH, Fmoc-D-Phe-OH. Az utolsó N-terminális Fmoc-csoport lehasítása után a gyantát absz. etanollal mostam és exszikkátorban szárítottam. A peptidet a gyantáról TFA-fenol-EDT-tioanizol-deszt. víz (10 ml; 0,75 g; 0,25 ml; 0,5 ml; 0,25 ml) elegyével hasítottam le szobahőmérsékleten, 1,5 órás reakcióidővel. Ilyen hasítási körülmények között az ivDde védőcsoport érintetlen maradt. A hasított peptid feldolgozása a korábbi szintézisekkel megegyezően történt. A liofilizált nyers peptidet karakterizálás után (24. táblázat, Függelék **F39. ábra**) tisztítatlanul használtam fel a következő szintézislépésben.

A következő lépésben Boc-Aoa-OPcp-t (Boc-aminooxiecetsav-pentaklórfenil-észter) (1,5 ekvivalens, Mw=448,5, m=437 mg) kapcsoltam a peptid N-terminálisára DIEA (1,5 ekvivalens) jelenlétében dimetilformamidos oldatban (10 mg/ml peptid koncentráció) szobahőmérsékleten 24 órás reakcióidővel állandó kevertetés mellett. A reakcióidő lejártá után a reakcióelegyet vákuumban bepároltam, a peptidet A és B eluensek keverékében feloldottam, majd RP-HPLC-vel megtisztítottam, a frakciókat liofilizáltam és analizáltam (analitikai RP-HPLC, ESI-MS) (24. táblázat, Függelék **F40. ábra**).

A Boc védett lineáris peptidről az ivDde védőcsoportot 2% hidrazin/DMF tf% oldattal hasítottam le szobahőmérsékleten 1 órás reakcióidővel (1 mg/ml peptid koncentráció). A hasítási reakció során a diszulfid-híd a 2-es és 7-es pozícióban lévő ciszteinek között is kialakult. A 60 perc lejártá után a reakcióelegyet vákuumban bepároltam, majd megtisztítottam RP-HPLC-vel. A frakciókat liofilizáltam és analizáltam (analitikai RP-HPLC, ESI-MS) (24. táblázat, Függelék **F41. ábra**).

A ciklikus szomatosztatin származékról Boc védőcsoportot hasítottam 95% TFA, 5% H₂O elegyével 10 ekvivalens aminooxiecetsav jelenlétében szobahőmérsékleten kevertetve 30 perc alatt (10 mg/ml peptid koncentráció). Majd jéghideg dietil-éterbe öntöttem a peptid-aminooxiecetsav keverékének oldatát. A kicsapódott peptidet centrifugálással ülepítettem 5 percig 4000/perc fordulaton. A csapadékot RP-HPLC rendszerben megtisztítottam, majd a peptid érzékenysége miatt az Aoa-RC-121 peptidet liofilizálás nélkül, az oldószer eltávolítását követően azonnal felhasználtam a következő konjugálási lépésben. A peptidből egy kis mennyiséget liofilizáltam analízis céljából (analitikai RP-HPLC, ESI-MS) (24. táblázat, Függelék **F42. ábra**).

6.8.1.2 Konjugálás: oxim-kötés kialakítása: Dau=Aoa-RC-121 (18) előállítása

A megtisztított Aoa-RC-121 peptidet 0,2 M NaOAc pufferben (pH=5,0) feloldottam és 50% feleslegben daunorubicint adtam hozzá. Az oldatot 3 órán át kevertetem szobahőmérsékleten. A daunorubicin felesleget a konjugátum mellől RP-HPLC segítségével választottam el. A kapott Dau=Aoa-RC-121 konjugátumot analitikai RP-HPLC-vel, és ESI-MS-rel jellemeztem. (24. táblázat, Függelék F43. ábra).

6.8.2 A TT-232 referencia peptid (H-D-Phe-c[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Cys]-Thr-NH₂) és a hidrazon-kötésű daunorubicin-TT232 konjugátum (Dau=N-NH-CO-(CH₂)₂-CO-TT-232) előállítása

A konjugátumok vizsgálata során referencia vegyületként a módosítatlan, hatóanyagot nem tartalmazó ciklikus TT-232 peptidet alkalmaztam. Négy különböző daunorubicin hatóanyaggal konjugált TT-232 származékot állítottam elő, amelyek közül három oxim-kötéssel (Dau=Aoa-D-Phe-c[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Cys]-Thr-NH₂, Dau=Aoa-Leu-Arg-Arg-Tyr-D-Phe-c[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Cys]-Thr-NH₂, Dau=Aoa-Tyr-Arg-Arg-Leu-D-Phe-c[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Cys]-Thr-NH₂) kapcsolódik a tumorelles szerhez, míg egy hidrazon-kötéssel (Dau=N-NH-CO-(CH₂)₂-CO-D-Phe-c[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Cys]-Thr-NH₂).

6.8.2.1 A lineáris TT-232 és a hidrazin csoporttal funkcionizált TT-232 származék peptidek előállítása

A TT-232 és az N-terminálisán hidrazin csoporttal módosított lineáris TT-232 peptidek szintézisét Fmoc/^tBu stratégiával Rink-Amid MBHA gyantán (0,64 mmol/g, 1000 mg) manuálisan a 6.2.1. pontban leírt protokoll alapján valósítottam meg, amelyeket a 44. ábrán foglaltam össze. A következő Fmoc-védett aminosavszármazékokat alkalmaztam a szintézishez: Fmoc-Thr(^tBu)-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-D-Trp-OH, Fmoc-Tyr(^tBu)-OH, Fmoc-D-Phe-OH. A hét aminosavból álló alaplánc felépítése után a gyantát két részre osztottam. Az egyik részletről Fmoc-védőcsoportot hasítottam, a másik részletre pedig az Fmoc-hasítás után Boc-hidrazin-csoportot építettem be, amelyhez Boc-NH-NH-CO-(CH₂)₂-COOPcp aktív észter származékot (Mw=480,5) alkalmaztam DIEA bázis jelenlétében (3 ekvivalens reagens, aktív-észter : DIEA=1:1, 380 mg, 134 µl). A kapcsolási reakció 12 órás volt. Ezután a gyantákat absz. etanollal mostam és exszikátorban szárítottam.

A TT-232 lineáris peptidet a gyantáról a GnRH szintézisekkel megegyező körülmények között (15 perc + 1,5 óra) hasítottam le. Azonban a hasítás után a nyers peptid mennyisége

kevésnek bizonyult, ezért a hasítás után visszamaradt gyantát kiszárítottam és visszamértem. A gyanta tömege alapján arra következtettem, hogy a peptid nem hasadt le a gyantáról teljes mennyiségében. Ezért a szintézist megismételtem és a megismételt szintézis esetén a hasítást egymás után háromszor, mindig friss hasítóeleggyel (10 ml; 9,5 ml TFA; 250 µl H₂O; 250 µl TIS), megnövelt 2,5 órás reakcióidővel hajtottam végre. Az egyes hasítások után kapott nyers peptid részleteket külön dolgoztam fel. A nyers peptid várt mennyisége 739,0 mg volt, az egyes hasításokból összesen 642,1 mg-ot kaptam. A liofilizált nyers termékek mennyiségét a 26. táblázatban foglaltam össze. A továbbiakban minden TT-232 származéknál ezt a hasítási protokollt alkalmaztam.

A nyerstermékeket RP-HPLC-vel tisztítottam. A tisztítás során a peptideket DMF-ban oldottam, mivel a peptidek csak mérsékelten oldódtak a HPLC eluensek keverékében. Tisztítás után a termékeket liofilizáltam és analizáltam (analitikai RP-HPLC, ESI-MS) (28. táblázat, Függelék F44.-45. ábra).

6.8.2.2 Ciklizálás: ciklizált TT-232 és hidrazin-funkcionalizált TT-232 peptidek előállítása diszulfid-híd kialakításával

A ciklizálási lépés 8,1-es pH-jú 0,1 M koncentrációjú Tris pufferben hajtottam végre (peptid koncentráció: 0,2 mg/ml). A ciklizálást 1,5 napig végeztem, majd az oldatot TFA-val megsavanyítottam úgy, hogy az oldat pH-ja 3 és 4 között legyen. A megsavanyított oldatokat liofilizáltam. A liofilizált peptideket RP-HPLC-vel tisztítottam, a kapott frakciókat liofilizáltam és analizáltam (analitikai RP-HPLC, ESI-MS) (28. táblázat, Függelék F46.-47. ábra).

6.8.2.3 Konjugálás: hidrazon-kötés kialakítása: $\text{Dau}=\text{N}-\text{NH}-\text{CO}-(\text{CH}_2)_2-\text{CO}-$ TT-232 előállítása

A konjugálási reakciót a korábban ismertetett oxim-kötés kialakításával megegyező körülmények között hajtottam végre. A konjugátum tisztítása azonban nem az általánosan alkalmazott RP-HPLC körülmények között folyt, ugyanis a sav érzékeny hidrazon-kötésű vegyület a TFA-s eluensekben elbomlik, a pufferek alkalmazása pedig a HPLC rendszerben az elválasztást rontja, továbbá az oszlop, a készülék károsodását is okozhatja. Ezért ebben az esetben méretkizárásos kromatográfiát alkalmaztam. Az oszlop töltet Sephadex G10 volt, az elválasztáshoz alkalmazott eluens pedig 0,2M NH₄OAc (pH=5,0). Az oszlopról gyűjtött frakciókat az NH₄OAc eltávolítása érdekében többször újra liofilizáltam majd analizáltam (analitikai RP-HPLC, ESI-MS) (27. táblázat, Függelék F48. ábra).

6.8.2.4 Az N-terminálisán aminooxiacetyl-csoporttal módosított TT-232 származékok előállítás (Aoa-*D*-Phe-c[Cys-Tyr-*D*-Trp-Lys-Cys]-Thr-NH₂, Aoa-Leu-Arg-Arg-Tyr-*D*-Phe-c[Cys-Tyr-*D*-Trp-Lys-Cys]-Thr-NH₂, Aoa-Tyr-Arg-Arg-Leu-*D*-Phe-c[Cys-Tyr-*D*-Trp-Lys-Cys]-Thr-NH₂)

A peptidek szintézisét a 41. és 42. ábrákon foglaltam össze. Első lépésben a lineáris TT-232 analógot állítottam elő Fmoc/^tBu stratégiával Rink-Amid MBHA gyantán (0,64 mmol/g, 1000 mg) manuálisan a 6.2.1. pontban leírt protokoll alapján. A következő Fmoc-védett aminosavszármazékokat alkalmaztam a szintézishez: Fmoc-Thr(^tBu)-OH, Fmoc-Cys(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Dde)-OH, Fmoc-*D*-Trp-OH, Fmoc-Tyr(^tBu)-OH, Fmoc-*D*-Phe-OH. Az alaplánc felépítése után a gyantát három részre osztottam. Az első részletről Fmoc védőcsoportot hasítottam, a második és harmadik részleten tovább folytattam a szintézist, katepszin B enzimre érzékeny távtartó egységekkel (YRRL, LRRY) hosszabbítottam meg a peptideket a következő Fmoc-védett aminosavszármazékokat alkalmazva: Fmoc-Tyr(^tBu)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Leu-OH. Az utolsó Fmoc-csoport lehasítása után a gyantákat absz. etanollal mostam és exsikkátorban szárítottam.

A kész peptideket a gyantáról az előző szintézisekkel megegyező módon hasítottam le. Ilyen körülmények között az Dde védőcsoport a lizinen maradt. A nyerstermékeket RP-HPLC-vel tisztítottam, tisztítás után a termékeket liofilizáltam és analizáltam (analitikai RP-HPLC, ESI-MS) (29. táblázat, Függelék **F49.-F51. ábra**).

A következő lépésben Boc-Aoa-OPcp-t kapcsoltam a peptidek N-terminálisára DIEA (1,5 ekvivalens) jelenlétében DMF-os oldatban (10 mg/ml peptid koncentráció) szobahőmérsékleten 24 órás reakcióidővel állandó kevertetés mellett. A reakcióidő lejáta után a reakcióelegyet vákuumban bepároltam, majd RP-HPLC-vel megtisztítottam, a frakciókat liofilizáltam és analizáltam (analitikai RP-HPLC, ESI-MS) (28. táblázat, Függelék **F52.-F54. ábra**).

A Boc-Aoa-TT-232(Dde), a Boc-Aoa-LRRY-TT-232(Dde) és a Boc-Aoa-YRRL-TT-232(Dde) peptidekről 2% hidrazin/DMF (tf%) oldatban a Dde védőcsoportokat lehasítottam szobahőmérsékleten 2 órás reakcióidővel (1 mg/ml peptid koncentráció). A hasítási reakció során a diszulfid-híd is kialakult. A két óra lejáta után a reakcióelegyet vákuumban bepároltam, majd megtisztítottam RP-HPLC-vel. A frakciókat liofilizáltam és analizáltam (analitikai RP-HPLC, ESI-MS) (28. táblázat, Függelék **F55.-F57. ábra**).

A megkapott ciklikus származékokról lehasítottam a Boc védőcsoportot 95% TFA, 5% H₂O elegyével 10 ekvivalens aminooxiacetsav jelenlétében szobahőmérsékleten kevertetve 30

perc alatt (10 mg/ml peptid koncentráció). Majd jéghideg dietil-éterbe öntöttem a peptidek oldatait. A csapadékokat centrifugálással üleptettem 5 percig 4000/perc fordulaton. A csapadékokat RP-HPLC rendszerben megtisztítottam, majd a termékeket liofilizálás nélkül, az oldószer eltávolítását követően azonnal felhasználtam a következő konjugálási lépésben a peptidek érzékenysége miatt. A peptidekből egy kis mennyiséget liofilizáltam analízis céljából (analitikai RP-HPLC, ESI-MS) (28. táblázat, Függelék F58.-F60. ábra).

6.8.2.5 Konjugálás: oxim-kötés kialakítása: Dau=Aoa-TT-232, Dau=Aoa-YRRL-TT-232, Dau=Aoa-LRRY-TT-232 előállítása

A konjugációt a Dau-GnRH oxim-kötésű konjugátumok mintájára végeztem el azonos körülmények között. A reakcióelegyet RP-HPLC-vel tisztítottam. A kapott frakciókat liofilizáltam és analizáltam (analitikai RP-HPLC, ESI-MS) (29. táblázat, Függelék F61.-F63. ábra).

6.8.3 A TT-232 származékok *in vitro* citosztatikus hatásának vizsgálata

A peptid illetve a konjugátumok *in vitro* citosztatikus hatását HT-29 sejteken MTT-tesztel vizsgáltam a 6.3.3 pontban leírt protokoll alapján. Az irodalmi adatokból kiindulva a sejteket 24 órán át kezeltem a vegyületekkel (30. táblázat).

6.9 Különböző célbajuttató egységet tartalmazó konjugátumok alkalmazása kombinációban

A konjugátumok *in vitro* antiproliferatív hatását kombinációban HT-29 sejteken vizsgáltam MTT-tesztel a 6.3.3. pontban leírt protokoll alapján. A vizsgálatokhoz a GnRH-III konjugátumok közül a 4-es helyzetben vajsavval acilezett, 8-as helyzetben oxim-kötésben daunorubicint tartalmazó biokonjugátumot: GnRH-III(⁴Lys(nBu), ⁸Lys(Dau=Aoa)) (3) választottam. Szomatostatatin származék irányító molekulát tartalmazó konjugátumok közül a Dau=LRRY-Aoa-TT-232 (19) konjugátumot alkalmaztam. A kombinációs kísérletekben a kezelések különféle konstrukciókban történtek, amelyeket a 31. táblázatban foglaltam össze. A tesztekben a vegyületek daunorubicin tartalomra számított legmagasabb koncentrációja 100 µM volt. A vizsgált vegyületek bemérései úgy lettek meghatározva, hogy a legmagasabb koncentráció, amiből a hígítások készültek a daunorubicin tartalomra nézve 100 µM legyen.

7 Összefoglalás

A statisztikák alapján a rák a szív-, és érrendszeri betegségek után a második leggyakoribb halálok. Minden harmadik rákbetegség megelőzhető lenne, ezért nagyon fontos, hogy tisztában legyünk azzal, mit tehetünk annak érdekében, hogy elkerüljük. Az egészséges életmód mellett fontos, hogy részt vegyünk a szűrővizsgálatokon is, hiszen a daganatos betegségek eredményesebben kezelhetőek, ha azokat korai állapotban ismerik fel.

A kemoterápia a legáltalánosabban alkalmazott eljárás előrehaladott vagy áttétes rákos megbetegedések gyógyítására. A módszer hatékonyságát korlátozza a rákos sejtek kialakuló rezisztenciája, valamint a szelektivitás hiánya és a hatóanyagok toxikus mellékhatásai. A rákkutatás figyelme jelenleg a nagyobb hatékonyságú, kevesebb mellékhatással rendelkező szelektívebb, irányított módszerekre fókuszál.

Az irányított terápia kifejlesztésének célja, a szabad hatóanyag molekulák alkalmazása során felmerülő problémák visszaszorítása (pl.: toxicitás, gyors kiürülés a keringésből, szelektivitás hiánya, a tumoros sejtek multidrogrezisztenciája).

Számos peptidhormonról bizonyított (pl.: GnRH, szomatosztatin, bombezin), hogy tumoros sejteken (emlő-, petefészek-, méhnyak-, prosztata-, vese-, agy-, hasnyálmirigy rák, melanóma, non-Hodgkin limfóma) nagy koncentrációban expresszálódnak, így különböző citotoxikus ágenshez kapcsolt peptid ligandumok célpontjai lehetnek. Tehát a peptid hormonok és hormon analógok közvetlenül a tumoros sejtekhez szállíthatják a citotoxikus szert, ezáltal növelve a hatóanyag koncentrációt a tumoros szövetben, és megvédve az egészséges sejteket a szükségtelen hatóanyag felvételtől.

Doktori munkámmal az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoportjában folytatott kutatásokba kapcsolódtam be. Munkám során olyan új, az irányított tumorterápiában alkalmazható vegyületeket állítottam elő és tanulmányoztam, amelyek tumorelles hatóanyagot (daunorubicin, 2-pirrolino-daunorubicin, kurkumin) és irányító molekulaként különböző peptidhormon analógokat tartalmaznak. Célbajuttató vegyületnek önmagukban is tumorelles hatással rendelkező GnRH és szomatosztatin származékokat alkalmaztam. Megvizsgáltam az irányító molekulák, a peptidhormon származékokban végbevitt változtatások, a célbajuttató egység és a hatóanyag molekula közötti kötés típusok szerepét elsősorban a konjugátumok *in vitro* citosztatikus hatására, továbbá a vegyületek szerkezetére, sejtbejutási, penetrációs és receptorkötődési képességére, valamint oldhatósági tulajdonságára, és *in vivo* tumorelles hatására. Egyes konjugátumok esetén meghatároztam azok lehetséges hatóanyagtartalmú metabolitjait.

7.1 Négyes helyzetben zsírsav láncokkal módosított daunorubicin-GnRH-III biokonjugátumok

Megnövekedett enzim stabilitású, sejtbejutási képességű, tumorelles hatású, 4-es helyzetben szerin helyett rövid szénláncú zsírsavakkal acilezett lizint tartalmazó GnRH-III analógokat (GnRH-III(⁴Lys(X), ⁸Lys(Dau=Aoa))) állítottam elő. A biokonjugátumok enzimatis lebmolását patkány máj lizoszóma homogenátum, a stabilitásukat α -kimotripszin jelenlétében illetve sejttenyésztő médiumban vizsgáltam. A biokonjugátumok lebmolása α -kimotripszin hatására nagymértékben függött a zsírsavlánc típusától. A lizoszómális emésztményekből szabad daunorubicint nem azonosítottam, a legkisebb hatóanyagtartalmú metabolit minden vegyület esetében a H-Lys(Dau=Aoa)-OH volt, amely bizonyítottan képes kötődni a DNS-hez. A zsírsavláncok lehasadását is azonosítottam.

In vitro citosztatikus hatásukat és sejtbejutási képességüket HT-29 és MCF-7 sejteken teszteltem. A zsírsavláncok típusa jelentősen befolyásolta a konjugátumok sejtfevételét. A különbségek magyarázata érdekében a biokonjugátumok másodlagos szerkezetét CD spektroszkópiával, a lipofilitásukat víz-oktanol megoszlási hányadosuk, illetve penetrációs képességük meghatározásával vizsgáltam. Valamint a normál vajsavval módosított konjugátum esetén meghatároztam GnRH-I receptorhoz való affinitását. A szerkezetvizsgálati módszerek nem adtak magyarázatot a konjugátumok sejtfevétele során kapott eredményekre. Viszont a GnRH-III(⁴Lys(nBu), ⁸Lys(Dau=Aoa)) (3) konjugátum nagy affinitással kötődött a GnRH-I receptorokhoz. Az *in vitro* tesztek alapján legígéretesebbnek mutatkozó GnRH-III(⁴Lys(nBu), ⁸Lys(Dau=Aoa)) (3) konjugátum *in vivo* antitumor hatását ortotopikus HT-29 xenografton vizsgáltuk meg. A vegyület szignifikánsan gátolta a HT-29 primer daganatok növekedését.

7.2 Négyes helyzetben vajsavval módosított két daunorubicint tartalmazó GnRH-III biokonjugátumok

A tumorelles hatás fokozása érdekében két molekula daunorubicint valamint vajsavat tartalmazó GnRH-III származékokat állítottam elő GnRH-III(⁴Lys(nBu), ⁸Lys(Dau=Aoa-X-Y-Lys(Dau=Aoa-X-Y))), X= Ø vagy GFLG, Y= Ø vagy O₂Oc). A daunorubicint oxim-kötés kialakításával közvetelenül vagy GFLG katepszin B enzimre érzékeny spacer szekvencián, és/vagy az oldékonyág növelés céljából alkalmazott etilén-glikol származékon keresztül konjugáltam. Vizsgáltam a vegyületek oldékonyágát, degradációjukat patkány máj lizoszóma jelenlétében, valamint *in vitro* citosztatikus hatásukat HT-29 és MCF-7 sejteken. A

vegyületek alapjául szolgáló GnRH-III(⁴Lys(nBu), ⁸Lys(Dau=Aoa)) (**3**) vegyület *in vitro* citosztatikus hatását nem haladta meg egyik konjugátum sem. Azonban az etilén-glikol egységgel módosított vegyületek esetén javulást tapasztaltam az azt nem tartalmazókhöz képest, különösen a **11**-es biokonjugátum (X= GFLG, Y= O₂Oc)) esetén. Ezt a különbséget alátámasztották az oldékonysági kísérletek eredményei is. Az emésztési vizsgálatok során a legkisebb azonosított daunorubicin tartalmú metabolit az egyes konjugátumok esetén nagyban függött a vegyület szerkezetétől. Az etilén-glikol származékot vagy a GFLG spacer tartalmazók nagyobb mértékben degradálódtak. Ezért a kisebb metabolitok keletkezése szintén magyarázhatja ezen konjugátumok nagyobb hatékonyságát.

7.3 Négyes helyzetben vajsavval módosított 2-pirrolino-daunorubicin-GnRH-III biokonjugátum

A rendkívül hatásos 2-pirrolino-doxorubicin analójként előállított 2-pirrolino-daunorubicint 4-es pozícióban vajsavval acilezett lizint tartalmazó GnRH-III analógba építettem be oxim-kötésen keresztül és megvizsgáltam *in vitro* citosztatikus hatását HT-29 és MCF-7 sejteken. A konjugátum egy nagyságrenddel hatásosabb volt, mint a daunorubicint tartalmazó GnRH-III(⁴Lys(nBu), ⁸Lys(Dau=Aoa)) (**3**) származék.

7.4 Négyes helyzetben vajsavval módosított daunorubicin-GnRH-I és GnRH-II biokonjugátumok

A 4-es pozícióban vajsavval acilezett lizint és a 6-os helyzetben oxim-kötéssel daunorubicint tartalmazó [*D*-Lys⁶]GnRH-I és [*D*-Lys⁶]GnRH-II konjugátumokat állítottam elő, hogy megvizsgálhassam ezen vegyületek esetén is növeli-e a konjugátumok aktivitását a ⁴Ser – ⁴Lys(nBu) csere, mint ahogyan azt a GnRH-III analógnál tapasztaltam. Agonista [*D*-Lys⁶]GnRH-I illetve [*D*-Lys⁶]GnRH-II származékokat tartalmazó konjugátumok *in vitro* citosztatikus hatását HT-29 sejteken vizsgáltam.

A GnRH-I(⁴Lys(nBu), *D*-⁶Lys(Dau=Aoa)) (**13**) esetén a vajsav beépítése minimális javulást eredményezett a citosztatikus hatásban, míg a GnRH-II esetében ez a módosítás a citosztatikus hatás szignifikáns növekedésével járt. Azonban a 4-es helyzetben vajsavval acilezett GnRH-III-daunorubicin konjugátum hatása mindkettőnél jobb volt.

7.5 Irányított tumorterápiában alkalmazható kurkumin tartalmú vegyületek előállítása

Klikk-reakcióval 8-as helyzetben kurkumin tartalmú GnRH-III konjugátumot állítottam

elő. A reakció alacsony hozama miatt és a kurkumin biohasznosíthatóságát növelendő a jövőben olyan liposzómákba tervezem a hatóanyagot bezárni, amelyek GnRH-III irányító molekulákat tartalmaznak.

7.6 Daunorubicin tartalmú szomatosztatin analóg biokonjugátumok

Önmagában is jelentős tumorelles hatással rendelkező szomatosztatin származékokat, mint irányító molekulákat (RC-121, TT-232) tartalmazó daunorubicin konjugátumokat állítottam elő. Az RC-121 esetén a daunorubicin oxim-kötéssel kapcsolódik a peptid N-terminálisára. A peptid az N-terminális módosítás ellenére megőrizte tumorelles hatását a konjugátumban, bár az egy nagyságrenddel rosszabb volt, mint a szabad hatóanyag.

A TT-232 konjugátumokban a hatóanyag hidrazon-kötés illetve oxim-kötés kialakításával közvetlenül vagy katepszin B enzimre érzékeny távtartó szekvencián (YRRL vagy LRRY) keresztül kapcsolódott: Dau=hidrazon-TT-232 (17) Dau=Aoa-TT-232 (18) Dau=Aoa-LRRY-TT-232 (19) Dau=Aoa-YRRL-TT-232 (20). A konjugátumok *in vitro* citosztatikus hatását HT-29 sejteken vizsgáltam. A vegyületekben a TT-232 megőrizte tumorelles hatását N-terminálisának módosítása ellenére. Mind a négy konjugátum hatásosabb volt, mint az irányító molekula önmagában. A legnagyobb mértékben a Dau=Aoa-LRRY-TT-232 (19) gátolta a tumorsejtek osztódását, továbbá ez a vegyület közelítette meg leginkább a daunorubicin hatását is.

7.7 Különböző célbajuttatóegységet tartalmazó konjugátumok alkalmazása kombinációs kezelésekben

A kombinált terápia során a kezelés különböző irányító molekulákat tartalmazó konjugátumok adagolásával történik. Így különböző célpontokon támadva egymást felerősítve fejthetik ki tumorelles hatásukat. A kombinált kezelések során GnRH-III (GnRH-III(⁴Lys(nBu), ⁸Lys(Dau=Aoa)) (3) illetve szomatosztatin analógot tartalmazó konjugátumot (Dau=Aoa-LRRY-TT-232 (19)) alkalmaztam együttesen többféle konstrukcióban. Általánosságban elmondhatom, hogy a TT-232 konjugátum sejtszaporodást gátló hatását egyik konstrukcióval sem sikerült felülmúlni, bár minden esetben jobb hatást értem el, mint a GnRH-III vegyület önmagában mutatott antiproliferatív hatása.

Összességében elmondható, hogy új szintézis utak kidolgozásával új, hatékony, a rákos megbetegedések gyógyításában alkalmazható vegyületeket állítottam elő. Közülük legígéretesebbek a GnRH-III(⁴Lys(nBu), ⁸Lys(PyrDau=Aoa)) (12) illetve a Dau=Aoa-LRRY-TT-232 (19).

8 Irodalomjegyzék

1. Nyitrai J., Nagy J., **1998**, Budapest, Magyar Kémikusok Egyesülete
2. Jones J.H., *J. Pept. Sci.*, **1999**, 5, 465-471.
3. Nemzeti Rákregiszter: http://www.oncol.hu/rakreg/stat/2011_orzagos.pdf
(2014.03.18.)
4. Scharlau D., Borowicki A., Habermann N., Hofmann T., Klenow S., Miene C., Munjal U., Stein K., Gleit M., *Mutat. Res.*, **2009**, 682, 39-53.
5. Willcox M.L., Bodeker G., *Bull. World Health Organ.*, **2004**, 329, 1156-1159.
6. Tilburt J.C., Kaptchuk T.J., *Bull. World Health Organ.*, **2008**, 86, 594-599.
7. Stierle A., Strobel G., Stierle D., *Science*, **1993**, 260, 214-216.
8. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/> (2014.03.18.)
9. Balázs A., Daganatbiológia, *Gondolat kiadó*, Budapest, **1984**
10. Beyersdorff D., *Medicina Könyvkiadó Rt.*, Budapest, **1999**
11. Hirsch J., *The J. Am. Med. Ass.*, **2006**, 296, 1518-1520.
12. Bosch F., Rosich L., *Pharmacology*, **2008**, 82, 171-179.
13. Klein S., Levitzki A., Targeted cancer therapy: promise and reality, *Adv. Cancer Res.*, **2007**, 97, 295-319.
14. Reichlin S., *N. Engl. J. Med.*, **1983**, 15, 309, 1495-1501.
15. Fink G., *Academic Press*, San Diego, **1999**
16. Schally A.V., Comaru-Schally A.M., Nagy A., Kovács M., Szepesházi K., Plonowski A., Varga J.L., Halmos G., *Front Neuroendocrinol.*, **2001**, 22, 248-291.
17. Reubi J.C., *Endocr. Rev.*, **2003**, 24, 389-427.
18. Matsuo H., Baba Y., Nair R.M., Arimura A., Schally A.V., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1971**, 43, 1334-1339.
19. Fonyó A., *Medicina Könyvkiadó Rt.*, Budapest, **1998**
20. Sills E. S. (szerkesztő), *Nova Publishing*, New York, **2013**
21. Horváth Cs., *Melania Kiadó*, Budapest, **2002**
22. Schneider F., Tomek W., Gründker C., *Theriogenology.*, **2006**, 66, 691-709.
23. Kanda A., Takahashi T., Satake H., Minakata H., *Biochem. J.*, **2006**, 395, 125-135.
24. Limonta P., Moretti R.M., Marelli M.M., Motta M., *Front. Neuroendocrinol.*, **2003**, 24, 279-295.
25. Millar R.P., *Anim. Reprod. Sci.*, **2005**, 88, 5-28.
26. Kraus S., Naor Z., Seger R., *Cancer Lett.*, **2006**, 234, 109-123.

27. Schultze-Mosgau A., Griesinger G., Altgassen C., von Otte S., Hornung D., Diedrich K., *Expert. Opin. Investig. Drugs*, **2005**, 14, 1085-1097.
28. Pályi I., Vincze B., Lovas S., Mező I., Pató J., Kálnay A., Turi G., Gaál D., Mihalik R., Péter I., Teplán I., Murphy R.F., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1999**, 96, 2361-2366.
29. Baumann K.H., Kiesel L., Kaufmann M., Bastert G., Runnebaum B., *Breast Cancer Res. Treat.*, **1993**, 25, 37-46.
30. Ohno T., Imai A., Furui T., Takahashi K., Tamaya T., *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **1993**, 169, 605-610.
31. Imai A., Ohno T., Iida K., Fuseya T., Furui T., Tamaya T., *Gynecol. Oncol.*, **1994**, 55, 144-148.
32. Nagy A., Schally A.V., *Biol. Reprod.*, **2005**, 73, 851-859.
33. Pawson A.J., Morgan K., Maudsley S.R., Millar R.P., *Reproduction*, **2003**, 126, 271-278.
34. Mező G., Manea M., *Expert Opin. Ther. Pat.*, **2009**, 19, 1771-1785.
35. Naor Z., Atlas D., Clayton R.N., Forman D.S., Amsterdam A., Catt K.J., *J. Biol. Chem.*, **1981**, 256, 3049-3052.
36. Nagy A., Schally A.V., *Drugs Fut.*, **2002**, 27, 359-370.
37. Mező G., Manea M., Szabó I., Vincze B., Kovács M., *Curr. Med. Chem.*, **2008**, 15, 2366-2379.
38. Emons G., Sindermann H., Engel J., Schally A.V., Gründker C., *Neuroendocrinology*, **2009**, 90, 15-18.
39. Szepesházi K., Schally A.V., Block N.L., Halmos G., Nadji M., Szalontay L., Vidaurre I., Abi-Chaker A., Rick F.G., *Oncotarget.*, **2013**, 4, 751-760.
40. Millar R.P., *Trends Endocrinol. Metab.*, **2003**, 14, 35-43.
41. Neill J.D., Musgrove L.C., Duck L.W., *Trends Endocrinol. Metab.*, **2004**, 15, 383-392.
42. White R.B., Eisen J.A., Kasten T.L., Fernald R.D., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1998**, 95, 305-309.
43. Gründker C., Günthert A.R., Millar R.P., Emons G., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **2002**, 87, 1427-1430.
44. Gründker C., Völker P., Schulz K.D., Emons G., *Gynecol. Oncol.*, **2000**, 78, 194-202.
45. Eicke N., Günthert A.R., Emons G., Gründker C., *Int. J. Oncol.*, **2006**, 29, 1223-1229.
46. Fister S., Günthert A.R., Aicher B., Paulini K.W., Emons G., Gründker C., *Cancer Res.*, **2009**, 69, 6473-6481.

47. Schally A.V., Comaru-Schally A.M., Nagy A., Kovács M., Szepesházi K., Plonowski A., Varga J.L., Halmos G., *Front Neuroendocrinol.* **2001**, 22, 248-291.
48. Manea M., Mező G., *Protein Pept. Lett.*, **2013**, 20, 439-449.
49. Sherwood N.M., Sower S.A., *Neuropeptides*, **1985**, 6, 205-214.
50. Sower S.A., Chiang Y.C., Lovas S., Conlon J.M., *Endocrinology*, **1993**, 132, 1125-1131.
51. Lovas S., Pályi I., Vincze B., Horváth J., Kovács M., Mező I., Tóth G., Teplán I., Murphy R.F., *J. Peptide Res.*, **1998**, 52, 384-389.
52. Kovács M., Vincze B., Horváth J.E., Seprődi J., *Peptides*, **2007**, 28, 821-829.
53. Kovács M., Seprődi J., Koppán M., Horváth J. E., Vincze B., Teplán I., Flerkó B., *J. Neuroendocrinol.*, **2002**, 14, 1-14.
54. Tsutsumi M., Zhou W., Millar R.P., Mellon P.L., Roberts J.L., Flanagan C.A., Dong K., Gillo B., Sealfon S.C., *Mol. Endocrinol.*, **1992**, 6, 1163-1169.
55. Neill J.D., Duck L.W., Sellers J.C., Musgrove L.C., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2001**, 282, 1012-1018.
56. Faurholm B., Millar R.P., Katz A.A., *Genomics*, **2001**, 78, 15-18.
57. Mező I., Lovas S., Pályi I., Vincze B., Kálnay A., Turi G., Vadász Z., Seprődi J., Idei M., Tóth G., Gulyás E., Ötvös F., Mák M., Horváth J.E., Teplán I., Murphy R.F., *J. Med. Chem.*, **1997**, 40, 3353-3358
58. Pályi I., Vincze B., Lovas S., Mező I., Pató J., Kálnai A., Túri G., Gaál D., Mihalik R., Péter I., Teplán I., Murphy R. F., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1999**, 96, 2361-2366
59. Kovács M., Vincze B., Horváth J.E., Seprődi J., *Peptides*, **2007**, 28, 821-829.
60. Herédi-Szabó K., Lubke J., Tóth G., Murphy R.F., Lovas, S., *Peptides*, **2005**, 26, 419-422.
61. Mező G., Czajlik A., Manea M., Jakab A., Farkas V., Majer, Z., Vass, E., Bodor, A., Kapuvári, B., Boldizsár, M., Vincze B., Csuka O., Perczel A., Przybylski M., Hudecz F., **2007** *Peptides*, 28 , 806-820.
62. Schreier V.N., Mező G., Orbán E., Dürr C., Marquardt A., Manea M., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2013**, 23, 2145-2150.
63. Pappa E.V., Zompra A.A., Spyrali Z., Diamantopoulou Z., Pairas G., Lamari F.N., Katsoris P., Spyroulias G.A., Cordopatis P., *Biopolymers (Pept. Sci.)*, **2011**, 96, 260-272.
64. Manea M., Leurs U., Orbán E., Baranyai Zs., Öhlschläger P., Marquardt A., Schulcz Á., Tejeda M., Kapuvári B., Tóvári J., Mező G., *Bioconj. Chem.*, **2011**, 22, 1320-1329.

65. Brazeau P., Vale W., Burgus R., Ling N., Butcher M., Rivier J., Guillemin R., *Science*, **1973**, 179, 77-79.
66. Bloom S.R., Polak J.M., *Br. Med. J.*, **1987**, 295, 288-290.
67. Patel Y.C., *J. Front Neuroendocrinol.*, **1999**, 20, 157-198.
68. Liebow C., Reilly C., Serrano M., Schally A.V., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1989**, 86, 2003-2007.
69. Lopez F., Estève J.P., Buscail L., Delesque N., Saint-Laurent N., Vaysse N., Susini C., *Metabolism.*, **1996**, 45, 14-16.
70. Florio T., Schettini G.J., *Mol. Endocrinol.*, **1996**, 17, 89-100.
71. Lee J.U., Hosotani R., Wada M., Doi R., Koshiba T., Fujimoto K., Miyamoto Y., Tsuji S., Nakajima S., Hirohashi M., Uehara T., Arano Y., Fujii N., Imamura M., *Eur. J. Cancer*, **2002**, 38, 1526-1534.
72. Mező G., Manea M., *Expert Opin. Drug Deliv.*, **2010** 7, 79-96.
73. Raderer M., Kurtaran A., Leimer M., Angelberger P., Niederle B., Vierhapper H., Vorbeck F., Hejna M.H., Scheithauer W., Pidlich J., Virgolini I., *J. Clin. Oncol*, **2000**, 18, 1331-1336.
74. Koukouraki S., Strauss L.G., Georgoulas V., Schuhmacher J., Haberkorn U., Karkavitsas N., Dimitrakopoulou-Strauss A., *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, **2006**, 33, 460-466.
75. Storch D., Béhé M., Walter M.A., Chen J., Powell P., Mikolajczak R., Mäcke H.R., *J. Nucl. Med.*, **2005**, 46, 1561-1569.
76. Liebow C., Reilly C., Serrano M., Schally A.V., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1989**, 86, 2003-2007.
77. Nagy A., Schally A.V., Halmos G., Armatis P., Cai R.Z., Csernus V., Kovács M., Koppán M., Szepesházi K., Kahán Z., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1998**, 95, 1794-1799.
78. Koppán M., Nagy A., Schally A.V., Arencibia J.M., Plonowski A., Halmos G., *Cancer Res.* **1998**, 58, 4132-4137.
79. Schally A.V., Engel J.B., Emons G., Block N.L., Pinski J., *Curr. Drug. Deliv.*, **2011**, 8, 11-25.
80. Schally A.V., Redding T.W., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1987**, 84, 7275-7279.
81. Kéri Gy., Mező I., Horváth A., Vadász Z., Balogh A., Idei M., Vántus T., Teplán I., Mák M., Horváth J., Pál K., Csuka O., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1993**, 191, 681-687.
82. Helyes Z., Szabó A., Németh J., Jakab B., Pintér E., Bánvölgyi A., Kereskai L., Kéri Gy., Szolcsányi J., *Arthritis Rheum.*, **2004**, 50, 1677-1685.

83. Szokolóczy O., Schwab R., Peták I., Orfi L., Pap A., Eberle A.N., Szűts T., Kéri Gy., *J. Recept. Signal Transduct. Res.*, **2005**, 25, 217-235.
84. Steták A., Veress R., Ovádi J., Csermely P., Kéri Gy., Ullrich A., *Cancer Res.*, **2007**, 67, 1602-1608.
85. Kéri Gy., Érchehyi J., Horváth A., Mező I., Idei M., Vántus T., Balogh A., Vadász Z., Bökönyi Gy., Seprődi J., Teplán I., Csuka O., Tejeda M., Gaál D., Szegedi Z., Szende B., Roze C., Kalthoff H., Ullrich A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **1996**, 93, 12513-12518.
86. Klein S., Levitzki A., *Adv. Cancer Res.*, **2007**, 97, 295-319.
87. Diaconu C.C., Szathmári M., Kéri Gy., Venetianer A., *Br. J. Cancer*, **1999**, 80, 1197-1203.
88. Tejeda M., Gaál D., Csuka O., Ullrich A., Schwab R., Pap A., Horváth A., Kéri Gy., *Cancer Detect. Prev.*, **2003**, 27, 155-162.
89. Tejeda M., Gaál D., Schwab R.E., Pap A., Kéri Gy., *Anticancer Res.*, **1999**, 19, 3265-3268.
90. Schwab R.E., Froidevaux S., Paku S., Tejeda M., Szende B., Pap A., Beglinger C., Eberle A.N., Kéri Gy., *Anticancer Res.*, **2001**, 21, 71-75.
91. Kma L., *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, **2014**, 15, 2405-2425.
92. Anand P., Sundaram C., Jhurani S., Kunnumakkara A.B., Aggarwal B.B., *Cancer Lett.*, **2008**, 267, 133-164.
93. Jurenka J.S., *Altern. Med. Rev.*, **2009**, 14, 141-153.
94. Zhou H., Beevers C.S., Huang S., *Curr. Drug Targets*, **2011**, 12, 332-347.
95. Ravindran J., Prasad S., Aggarwal B.B., *AAPS J.*, **2009**, 1, 495-510.
96. Sarkar F.H., Li Y., *Cancer Treat. Rev.*, **2009**, 35, 597-607.
97. Teiten M.H., Gaascht F., Eifes S., Dicato M., Diederich M., *Genes. Nutr.*, **2010**, 5, 61-74.
98. Kakarala M., Brenner D.E., Korkaya H., Cheng C., Tazi K., Ginestier C., Liu S., Dontu G., Wicha M.S., *Breast Cancer Res. Treat.*, **2010**, 122, 777-785.
99. Shoba G., Joy D., Joseph T., Majeed M., Rajendran R., Srinivas P.S., *Planta Med.*, **1998**, 64, 353-356.
100. Gupta S.C., Kismali G., Aggarwal B.B., *Biofactors*, **2013**, 39, 2-13.
101. Norris L., Karmokar A., Howells L., Steward W.P., Gescher A., Brown K., *Mol. Nutr. Food Res.*, **2013**, 57, 1630-1637.
102. Trowell H.C., Burkitt D.P., *Mol. Aspects Med.*, **1987**, 9, 7-15.
103. Ferguson L.R., Zhu S.T., Harris P.J., *Mol. Nutr. Food Res.*, **2005**, 49, 585-593.

104. Gibson G.R., Roberfroid M.B., *J. Nutr.*, **1995**, 125, 1401-1412.
105. Scharlau D., Borowicki A., Habermann N., Hofmann T., Klenow S., Miene C., Munjal U., Stein K., Glei M., *Mutat. Res.*, **2009**, 682, 39-53.
106. Ebert M.N., Klinder A., Peters W.H., Schäferhenrich A., Sendt W., Scheele J., Pool-Zobel B.L., *Carcinogenesis*, **2003**, 24, 1637-1644.
107. Pool-Zobel B.L., Selvaraju V., Sauer J., Kautenburger T., Kiefer J., Richter K.K., Soom M., Wölfl S., *Carcinogenesis*, **2005**, 26, 1064-1076.
108. Hague A., Diaz G.D., Hicks D.J., Krajewski S., Reed J.C., Paraskeva C., *Int. J. Cancer.*, **1997**, 72, 898-905.
109. He L., Li X., Luo H.S., Rong H., Cai J., *World J. Gastroenterol.*, **2007**, 13, 4015-4018.
110. Beyer-Sehlmeyer G., Glei M., Hartmann E., Hughes R., Persin C., Böhm V., Rowland I., Schubert R., Jahreis G., Pool-Zobel B.L., *Br. J. Nutr.*, **2003**, 90, 1057-1070.
111. DiMarco A., Soldati M., Fioretti A., Dasdia T., *Cancer Chemother. Rep.*, **1964**, 38, 39-47.
112. Fornari F.A., Randolph J.K., Yalowich J.C., Ritke M.K., Gewirtz D.A., *Mol. Pharmacol.*, **1994**, 45, 649-656.
113. Momparler R.L., Karon M., Siegel S.E., Avila F., *Cancer Res.*, **1976**, 36, 2891-2895.
114. Gewirtz D.A., *Biochem. Pharmacol.*, **1999**, 57, 727-741.
115. Granados-Principal S., Quiles J.L., Ramirez-Tortosa C.L., Sanchez-Rovira P., Ramirez-Tortosa M.C., *Food Chem. Toxicol.*, **2010**, 48, 1425-1438.
116. Simunek T., Stérba M., Popelová O., Adamcová M., Hrdina R., Gersl V., *Pharmacol. Rep.*, **2009**, 61, 154-171.
117. Flanagan P.A., Kopecková P., Kopecek J., Duncan R., *Biochim. Biophys. Acta*, **1989**, 993, 83-91.
118. Hudecz F., Clegg J.A., Kajtár J., Embleton M.J., Szekerke M., Baldwin R.W., *Bioconjug. Chem.*, **1992**, 3, 49-57.
119. Nagy A., Schally A.V., *Biol. Reprod.*, **2005**, 73, 851-859.
120. Schally A.V., Nagy A., *Life Sci.*, **2003**, 72, 2305-2320.
121. Mező G., Orbán E., Szabó I., Hegedüs R., Bösze Sz., Tejeda M., Gaál D., Kapuvári B., Manea M., *Collection Symposium Series 11*, **2009**, 72-76
122. Szabó I., Manea M., Orbán E., Csámpai A., Bösze Sz., Szabó R., Tejeda M., Gaál D., Kapuvári B., Przybylski M., Hudecz F., Mező G., *Bioconjug. Chem.*, **2009**, 20, 656-665.
123. Kalia J., Raines R.T., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2008**, 47, 7523-7526.
124. Shao J., Tam J.P., *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 3893-3899

125. Orbán E., Mező G., Schlage P., Csík G., Kulić Z., Ansorge P., Fellingner E., Möller H.M., Manea M., *Amino Acids*, **2011**, 41, 469-483.
126. Nagy A., Schally A.V., Armatis P., Szepeshazi K., Halmos G., Kovacs M., Zarandi M., Groot K., Miyazaki M., Jungwirth A., Horváth J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1996**, 93, 7269-7273.
127. Linsky K.F., Ignoffo R.J., *Cancer Pract.*, **1996**, 4, 288-290.
128. Stepankova J., Studenovsky M., Malina J., Kasparkova J., Liskova B., Novakova O., Ulbrich K., Brabec V., *Biochem. Pharmacol.*, **2011**, 82, 227-235
129. Studenovsky M., Ulbrich K., Ibrahimova M., Rihova B., *Eur. J. Pharm. Sci.*, **2011**, 42, 156-163.
130. Merrifield R.B., *J. Am. Chem.Soc.*, **1963**, 85, 2149–2154.
131. Lloyd-Williams P., Albericio F., Giralt E., *Tetrahedron*, **1993**, 49, 11065-11133.
132. Cudic M., Fields G.B., *Humana Press Inc.*, Totowa, **2008**
133. Bárány G., Merrifield R.B., *Academic Press*, New York, **1979**
134. Carpino L.A., Han G.Y., *J. Org. Chem.*, **1972**, 37, 3404-3409.
135. Bárány G., Kneib-Cordonier N., Mullen D.G., *Int.J.Pept.Prot.Res.*, **1987**, 30, 705-739.
136. Walker B., *Oxford University Press*, Oxford, **1994**
137. Wang S.S., *J. Am. Chem. Soc.*, **1973**, 95, 1328-1333.
138. Barlos K., Chatzi O., Gatos D., Stavropoulos G., *Int. J. Pept. Protein Res.*, **1991**, 37, 513-520.
139. Mergler M., Nyfeler R., Tanner R., Gosteli J., Grogg P., *Tetrahedron Lett.*, **1988**, 29, 4009-4012
140. Rink H., *Tetrahedron Lett.*, **1987**, 28, 3787-3790.
141. Garcia-Martin F., Quintanar-Audelo M., Garcia-Ramos Y., Cruz L.J., Gravel C., Furic R., Côté S., Tulla-Puche J., Albericio F., *J. Comb. Chem.*, **2006**, 8, 213-220.
142. König W., Geiger R., *Chem. Ber.* **1970**, 103, 788-798.
143. Castro B., Dormoy J.R., Evin G., Selve C., *Tetrahedron Lett.*, **1975**, 14, 1219-1222.
144. Coste J., Le-Nguyen D., Castro B., *Tetrahedron Lett.*, **1990**, 31, 205-208.
145. Dourtoglou V., Ziegler J.-C., Gross B., *Tetrahedron Lett.*, **1978**, 15, 1269-1272.
146. Pettit G. R., Taylor S.R., *J. Org. Chem.*, **1996**, 61, 2322-2325.
147. Kaiser E., Colecott R.L., Bosinger E.C.D., Cook P.I., *Anal. Biochem.*, **1970**, 34, 595-598.
148. Bruckner Gy., *Tankönyvkiadó*, Budapest, **1974**
149. Kaiser, E., Bosinger, C.D., Colecott, R.L., Olsen, D.B., *Anal. Chim. Acta*, **1980**, 118,

149-151.

- 150.** Fields G.B., Noble R.L., *Int. J. Pept. Protein Res.*, **1990**, 35, 161-214.
- 151.** Grant G. A., *W. H. Freeman & Company*, New York, **1992**
- 152.** Kremmer T., Torkos K., *Akadémiai Kiadó*, Budapest, **2008**
- 153.** Gross, J., *Springer*, Heidelberg, **2004**
- 154.** Lipton M.S., Pasa-Tolic L., *Humana Press*, New York, **2009**
- 155.** Schlosser G. (Szerk.: Orosz, Gy., Szabó, D.), *Eötvös Kiadó*, Budapest, **2012**
- 156.** Ho C.S., Lam C.W.K., Chan M.H.M., Cheung R.C.K., Law L.K., Lit L.C.W., Ng K.F., Suen M.W.M., Tai H.L., *Clin. Biochem. Rev.*, **2003**, 24, 3-12.
- 157.** Lecona E., Olmo N., Turnay J., Santiago-Gómez A., López de Silanes I., Gorospe M., Lizarbe M.A., *Biochem. J.*, **2008**, 409, 311-320.
- 158.** Kratz F., *J. Control. Release*, **2008**, 132, 171-183.
- 159.** Rose K., *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, 116, 30-33
- 160.** Mező G., Szabó I., Kertész I., Hegedüs R., Orbán E., Leurs U., Bősze Sz., Halmos G., Manea M., *J. Pept. Sci.*, **2011**, 17, 39-46
- 161.** Baranczewski P., Stańczak A., Sundberg K., Svensson R., Wallin A., Jansson J., Garberg P., *Pharmacol. Rep.*, **2006**, 58, 453–472.
- 162.** Malugin A., Kopecková P., Kopecek J., *J. Control. Release*, **2007**, 124, 6-10.
- 163.** Braslawsky G.R., Kadow K., Knipe J., McGoff K., Edson M., Kaneko T., Greenfield, R. S., *Cancer Immunol. Immunother.*, **1991**, 33, 367-374.
- 164.** Orbán E., Manea M., Marquadt A., Bánóczy Z., Csík G., Fellingner E., Bősze Sz., Hudecz F., *Bioconjug. Chem.*, **2011**, 22, 2154-2165.
- 165.** Emons G., Kaufmann M., Gorchev G., Tsekova V., Gründker C., Günthert A.R., Hanker L.C., Velikova M., Sindermann H., Engel J., Schally A.V., *Gynecol. Oncol.* **2010**, 119, 457-461.
- 166.** Perczel A., Laczkó I., Hollósi M., *Akadémiai Kiadó*, Budapest, **1994**
- 167.** Gasymov O.K., Abduragimov A.R., Glasgow B.J., *Anal. Biochem.* **2008**, 374, 386-395.
- 168.** Lipinski C.A., *Drug Discovery Today: Technologies*, **2004**, 1, 337–341.
- 169.** Mező G., (Szerk.: Farkas E., Ryadnov M.) *RSC Publishing*, Cambridge, **2013**
- 170.** Hill K., Péntes Cs.B., Schnöller D., Horváti K., Bősze Sz., Hudecz F., Keszthelyi T.É., *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2010**, 12, 11498-11506.
- 171.** Jabłonowska E., Bilewicz R., *Thin Solid Films*, **2007**, 515, 3962–3966
- 172.** Marcelja S., *Biochim. Biophys. Acta.*, **1974**, 367, 165-176.

173. Rózsa B., Nadji M., Schally A.V., Dezső B., Flasko T., Tóth G., Mile M., Block N.L., Halmos G., *Prostate*, **2011**, 71, 445-452.
174. Leurs U., Mező G., Orbán E., Ohlschläger P., Marquardt A., Manea M., *Biopolymers*, **2012**, 98, 1-10.
175. Leurs U., Lajkó E., Mező G., Orbán E., Öhlschläger P., Marquardt A., Köhidai L., Manea M., *Eur. J. Med. Chem.*, **2012**, 52, 173-183.
176. Bartos A., Uray K., Hudecz F., *Biopolymers*, **2009**, 92, 110-115.
177. Bartos A., Hudecz F., Uray K., *Tetrahedron Lett.*, **2009**, 50, 2661-2663,
178. Malavolta L., Nakaie C.R., *Tetrahedron*, **2004**, 60, 9417-9424
179. Hegedüs R., Manea M., Orbán E., Szabó I., Sipos É., Halmos G., Mező G., *Eur. J. Med. Chem.*, **2012**, 56, 155-165.
180. Bajusz S., Janáky T., Csernus V.J., Bokser L., Fekete M., Srkalovic G., Redding T.W., Schally A.V., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1989**, 86, 6313-6317.
181. Szepesházi K., Schally A.V., Juhász A., Nagy A., Janáky T., *Anticancer Drugs*, **1992**, 3, 109-116.
182. Engel J.B., Schally A.V., Halmos G., Baker B., Nagy A., *Cancer*, **2005**, 104, 1312-1321.
183. Gründker C., Schlotawa L., Viereck V., Eicke N., Horst A., Kairies B., Emons G., *Eur. J. Endocrinol.*, **2004**, 151, 141-149.
184. Rahimpour S., Bilkis I., Péron V., Gescheidt G., Barbosa F., Mazur Y., Koch Y., Weiner L., Fridkin M., *Photochem. Photobiol.*, **2001**, 74, 226-236.
185. Huisgen R., *Proceedings of the Chemical Society of London*, **1961**, 357.
186. Kolb H.C., Sharpless K.B., *Drug Discov. Today*, **2003**, 8, 1128-1137.
187. Kolb H.C., Finn M.G., Sharpless K.B., *Angew. Chem.*, **2001**, 40, 2004-2021.
188. Bertozzi C.R., Bednarski M.D., *J. Org. Chem.*, **1991**, 56, 4326-4329.
189. Shi W., Dolai S., Rizk S., Hussain A., Tariq H., Averick S., L'Amoreaux W., El Idrissi A., Banerjee P., Raja K., *Org Lett.*, **2007**, 9, 5461-5464.
190. Shehzad A., Ul-Islam M., Wahid F., Lee Y.S., *J. Nanosci. Nanotechnol.*, **2014**, 14, 803-814.
191. Tóth I., Malkinson J.P., Flinn N.S., Drouillat B., Horváth A., Érchehyi J., Idei M., Venetianer A., Artursson P., Lazorova L., Szende B., Kéri Gy, *J. Med. Chem.*, **1999**, 42, 4010-4013.
192. Tejeda M., Gaál D., Hullán L., Csuka O., Schwab R., Szokoloczi O., Kéri Gy., *Anticancer Res.*, **2006**, 26, 3011-3015.

- 193.** Tejeda M., Gaál D., Csuka O., Kéri Gy., *Anticancer Res.*, **2005**, 25, 325-330.
- 194.** Erdei A. (Szerk.: dr. Nagy Katalin), *Medicina Kiadó*, Budapest, **2006**
- 195.** Leo A., Hansch C., Elkins D., *Chem. Rev.* **1971**, 71, 525-616.
- 196.** Halmos G., Arencibia J.M., Schally A.V., Davis R., Bostwick D.G., *J. Urol.*, **2000**, 163, 623-629.
- 197.** Munson P.J., Rodbard D., *Anal. Biochem.* **1980**, 107, 220–239.

9 Összefoglaló

A szív- és érrendszeri betegségek után a rákos megbetegedések okozzák a legtöbb halálesetet.

A daganatterápiában egyre inkább előtérbe kerülnek a tumoros sejteket célzottan támadó gyógyszerek, melyek hatékonyabb és kevesebb mellékhatással járó kezelést tesznek lehetővé. Számos peptid hormon receptorról bizonyított (pl.: GnRH, szomatosztatin, bombezin), hogy tumoros sejteken nagy mennyiségben expresszálódnak, így különböző citotoxikus ágenshez kapcsolt peptid ligandumok célpontjai lehetnek. Az egészséges sejteken nem, vagy csak kis mennyiségben találhatók meg ezen receptorok, ezért a peptid hormonok és hormon analógok közvetlenül a tumoros sejtekhez szállíthatják a hozzájuk kapcsolt citotoxikus hatóanyagot. A peptid hormon-hatóanyag komplex receptor mediált endocitózissal bejuthat a sejtbe, így növelve a hatóanyag koncentrációt a tumoros szövetben, és megvédve az egészséges sejteket a szükségtelen hatóanyag felvételtől. Mivel a hormon molekulák endokrin aktivitása nem túl kedvező a tumor terápiában, ezért a kutatások célja az antitumor hatás növelése mellett a hormonális hatás csökkentése. Erre a célra megfelelő vegyület a tengeri ingolából azonosított GnRH-III, illetve szomatosztatin analógok (RC-121 és TT-232).

Az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoportban végzett doktori munkám során 20 olyan új, az irányított tumorterápiában alkalmazható konjugátumokat állítottam elő, melyek célbajuttató egységként különböző GnRH illetve szomatosztatin származékokat, hatóanyagként pedig daunorubicint, 2-pirrolino-daunorubicint, valamint kurkumint tartalmaznak. Választ kerestem arra, hogy az irányító molekula, az abban véghez vitt módosítások, illetve a célbajuttató egység és a hatóanyag molekula közötti kötés típusok milyen módon befolyásolják elsődlegesen a konjugátumok *in vitro* citosztatikus hatását (önmagukban, kombinációban), valamint a vegyületek szerkezetét, stabilitását, sejtbejutását, penetrációs és receptorkötődési képességét, oldhatóságát, és *in vivo* tumorelles hatását.

Az eredmények alapján elmondható, hogy az előállított vegyületek között számos olyan konjugátum található, mely megnövekedett *in vitro*, illetve *in vivo* tumorelles hatással, stabilitással, hatékony sejtbejutási képességgel rendelkezik. Számos konjugátum hatása összemérhető a szabad hatóanyagok hatékonyságával. A kémiai és biológiai mérések bizonyították, hogy a kifejlesztett konjugátumok alkalmasak és hatékonyak lehetnek a tumoros megbetegedések gyógyításában. Közülük a legígéretesebbek a GnRH-III(⁴Lys(nBu), ⁸Lys(PyrDau=Aoa)) (**12**) illetve a Dau=Aoa-LRRY-TT-232 (**19**).

10 Summary

Cancer is one of the leading causes of death worldwide besides heart and other circulatory diseases.

Targeted tumor therapy is increasingly coming into view, because it is more effective and has less toxic side effects. Tumor targeting with the hormone peptides GnRH and somatostatin or their analogs is based on the discovery that their receptors are highly expressed in many tumor cells (e.g., prostate, ovarian, breast, endometrial), compared with their expression level in normal tissues. Therefore, these peptides could be used as carriers to which therapeutic agents are attached leading to the formation of conjugates which target the cancer cells directly resulting in increased selectivity. The lamprey GnRH-III is especially suitable as a targeting moiety because of its antiproliferative effect and weak endocrine activity in mammals. So does the somatostatin agonist RC-121 and TT-232.

During my work, prepared in the MTA-ELTE Research Group of Peptide Chemistry, 20 new bioconjugates, suitable for target tumor therapy were synthesized. The targeting moieties of the conjugates were different derivatives of GnRH and somatostatin and the drug molecules were daunorubicin, 2-pyrrolino-daunorubicin and curcumin, respectively.

The influence of the carrier molecules, the modifications in them, the type of the bond between the targeting compound and the drug, primary on the *in vitro* cytostatic effect (themselves and in combination) and on the structure, stability, cellular uptake, lipophilicity and receptor affinity of the conjugates as well as on their *in vivo* antitumor activity was investigated.

In summary, based on the results of my doctoral thesis, one can conclude, that some of the prepared conjugates had increased stability, were taken up by tumor cells more effectively and had enhanced antitumor activity *in vitro* and *in vivo*. The antiproliferative effect of some of these bioconjugates were comparable with the drug molecule itself. Found on the chemical and biological experiments, the developed new peptide hormone based conjugates are suitable for targeted drug delivery for the treatment of cancer. The most promising ones are the GnRH-III(⁴Lys(nBu), ⁸Lys(PyrDau=Aoa)) (**12**) and the Dau=Aoa-LRRY-TT-232 (**19**), respectively.